



TEKNILLINEN KORKEAKOULU

Kemian tekniikan osasto

Sara Heilimo

**FUUSIOPROTEIINIEN PEPTIDIKETJUN KATKAISU METALLI-
IONIEN AVULLA**

Diplomityö, joka on jätetty opinnäytteenä tarkastettavaksi diplomi-
insinöörin tutkintoa varten.

Espoossa 4.1.2005

Valvoja:

Professori Katrina Nordström

Ohjaaja:

Dosentti Markus Linder

Kiitos

Diplomityön kokeellinen osa tehtiin VTT Biotekniikan tutkimusyksikössä 16.3.2004–15.12.2004 välisenä aikana.

Haluan kiittää ohjaajaani Markus Linderiä kannustuksesta ja mielenkiinnosta työtäni kohtaan. Lämmin kiitos kuuluu myös Riitta Suihkoselle ja Arja Kiemalle avuliaisuudesta ja hyvistä neuvoista menetelmien opettelussa. Päivi Pihkalaa haluan kiittää tutkimusympyröihin perehdyttämisestä sekä mukavasta kahviseurasta. Kiitos kuuluu myös koko Proteiinimuokkaus -tutkimusryhmälle mukavasta ja innostavasta työilmapiiristä. Professori Katrina Nordströmiä haluan kiittää työni valvomisesta.

Vanhempiani haluan kiittää tuesta ja kannustuksesta koko opiskelujeni ajan. Erityisesti haluan kiittää puolisoani Teroa rakkaudesta sekä kuuntelemisesta ja kärsivällisyydestä etenkin tenttiviikkojen aikaan.

Espoossa 4.1.2005


Sara Heilimo

Tekijä Sara Heilimo	Päiväys 4.1.2005
	Sivumäärä 93 (+8)
Työn nimi Fuusioproteiinien peptidiketjun katkaisu metalli-ionien avulla	
Professuuri Soveltava mikrobiologia	Koodi Kem-30
Työn valvoja Professori Katrina Nordström	
Työn ohjaaja Dosentti Markus Linder	
<p>Työn kirjallisuusosassa on tarkasteltu fuusioproteiineja sekä fuusioproteiinitekniikan tarjoamia hyötyjä rekombinanttiproteiinien tuotossa. Fuusioproteiinien kemiallisia ja entsyymaattisia katkaisumenetelmiä on tarkasteltu yksityiskohtaisesti. Kirjallisuusosassa on myös perehdytty kupari-ionien rooliin luonnossa. Metallionien osallistumisesta proteiinien degradaatioon on kerrottu sekä tämän hetkiset tutkimustulokset kupari-ionien sekä rautakelaattien avulla tapahtuvasta proteiinien spesifisestä pilkkomisesta on esitelty.</p> <p>Työn kokeellisessa osassa tutkittiin kupari(II)ionilla tapahtuvaa fuusioproteiinin peptidiketjun katkeamisreaktiota. Fuusioproteiinin katkeaminen kahteen fuusioproteiini-partnereiden kokoa vastaaviin fragmentteihin saavutettiin kupari(II)ionin, askorbaatin sekä vetyperoksidin avulla noin tunnin inkuboinnilla. Reaktioolosuhteiden vaikutusta katkaisureaktioon tutkittiin. Katkaisureaktion tehokkuutta sekä spesifisyyttä pystyttiin parantamaan vaihtelemalla pH:ta, puskuria, reaktiolämpötilaa, reaktioaikaa sekä suola-, kupari(II)ioni- ja vetyperoksidikonsentraatioita. Katkaisureaktion todettiin olevan nopea ja korkealla reaktiolämpötilalla oli reaktiota kiihdyttävä vaikutus. Reaktioliuoksen suolapitoisuus paransi olennaisesti reaktion spesifisyyttä. Katkaisureaktion saannon todettiin olevan heikko eikä sitä olosuhteiden parantelusta huolimatta pystytty olennaisesti parantamaan.</p> <p>Katkaisureaktion tarkka katkeamiskohta selvitettiin. Katkeamistuotteet erotettiin kromatografisesti ja niiden N-terminaalinen sekvenssi sekä molekyylipaino määritettiin. Katkeamisreaktiossa todettiin 73,2 kDa fuusioproteiinin pilkkoutuneen 31,2 ja 41,9 kDa fragmenteiksi ja katkaisureaktion todettiin olevan spesifinen peptidilinkkerin histidiini-alueelle. Fuusioproteiinin N-terminaalisen katkeamistuotteen sekä katkeamattoman fuusioproteiinin N-terminukset olivat vahingoittumattomat. C-terminaalisen katkeamistuotteen N-terminaalista sekvenssiä ei saatu selville, johtuen todennäköisesti vapaan aminoryhmän puuttumisesta tai heterogeenisestä N-terminuksesta. Puhtaan fuusioproteiinin molekyyli-painon todettiin olevan oletettua pienempi ja virhe fuusioproteiinin geenissä tai proteiinin katkeaminen läheltä C-terminusta fuusioproteiinin tuotossa osoittautui mahdolliseksi.</p> <p>Kokeellisessa osassa tutkittu ilmiö on ollut tunnettu jo aiemmin, mutta sen spesifisyyttä ei ole aiemmin yritetty parantaa proteiinin muokkauksella. Nyt proteiinin spesifinen katkeaminen saavutettiin fuusioproteiiniin suunnitellusta erityisestä katkaisukohdasta. Kupari-ionien aiheuttama degradaatio pystyttiin ohjaamaan haluttuun kohtaan proteiinia histidiinijakson avulla.</p>	

Author Sara Heilimo	Date 4 January 2005
	Pages 93 (+8)
Title of thesis Use of metal ions for linker cleavage in fusion proteins	
Chair Applied microbiology	Chair Code Kem-30
Supervisor Professor Katrina Nordström	
Instructor Docent Markus Linder	
<p>In the literature survey part of this study, a short introduction of fusion proteins is given and the benefits of fusion protein technology are discussed. The most commonly used chemical and enzymatic cleavage methods of fusion proteins are introduced. The role of copper in nature is also discussed. Studies on copper ions and iron chelates in protein degradation and cleavage are reviewed.</p> <p>In the experimental part the copper ion based cleavage reaction of peptide linker in fusion proteins was studied. The fusion protein was cleaved in to two different sized protein fragments in the presence of copper (II) ions, ascorbate and hydrogen peroxide within an hour. The conditions affecting the cleavage and its specificity were studied. The specificity and the efficiency of the cleavage reaction could be influenced by varying the pH, buffer, temperature, reaction time and the concentrations of salt, copper and hydrogen peroxide. The cleavage reaction was found to be fast. Cleavage products could be detected even after few minutes of incubation. The rate of the cleavage reaction could be influenced by the reaction temperature. With higher reaction temperatures faster rates could be achieved. The cleavage was found to be abundant also in the temperature of 0 °C. Salt was found to reduce the unspecific cleavage considerably. The yield of the cleavage reaction was not very high and no improvement was achieved despite of various attempts to do so.</p> <p>The exact cleavage site was determined by N-terminal sequencing and molecular mass determination of the cleavage products. The masses of 73.2 kDa fusion protein and 31.2 and 41.9 kDa protein fragments were obtained. The cleavage reaction was found to be specific to the histidine area of the linker. The N-terminal sequences of the N-terminal cleavage product and of the uncleaved fusion protein were found to be intact. No N-terminal sequence for the C-terminal fusion partner was obtained probably due to a lack of free amino group in the N-terminus or as a consequence of heterogeneous N-terminus. The purified fusion protein was found to be shorter than expected in the mass analysis. Error in the fusion protein gene or cleavage near the C-terminus in the production of the fusion protein was found to be possible.</p> <p>The phenomenon studied in the experimental part has been known before, but protein engineering has not been previously used as a tool for improving the specificity. In this study, the specific cleavage of a protein was achieved at an engineered cleavage site. The degradation caused by copper ions was targeted to a specific site with histidine sequence.</p>	

SISÄLLYSLUETTELO

KIRJALLISUUSOSA	1
1 JOHDANTO.....	1
2 FUUSIOPROTEIINIT	2
3 FUUSIOPROTEIINIEN KATKAISU	5
3.1 ENTSYMAATTINEN KATKAISU	6
3.1.1 Seriiniproteaasit	7
3.1.2 Hyytymistekijä X ja trombiini	8
3.1.3 Enterokinaasi.....	9
3.1.4 TEV proteaasi.....	9
3.2 KEMIALLINEN KATKAISU	10
3.2.1 Syanogeenibromidi.....	11
3.2.2 Hydroksyyliamiini.....	12
3.2.3 Hapot.....	13
3.3 ITSEKATKAISU	14
4 KUPARI-IONIN ROOLI LUONNOSSA	17
4.1 KUPARIN ROOLI IHMISKEHOSSA	17
4.2 KUPARIPROTEIINIT	18
4.2.1 Tyrosinaasi.....	19
4.2.2 Sytokromioksidaasi.....	20
4.2.3 Cu/Zn superoksididismutaasi	21
4.2.4 Metallotioneiinit	23
4.3 KUPARI-IONIT JA RADIKAALIEN MUODOSTUS.....	24
4.3.1 Fenton ja Haber-Weiss -reaktiot	24
4.3.2 Askorbaatti	25
4.3.3 Kupari-ionien aiheuttama radikaalien muodostus ihmiskehossa	26
5 METALLI-IONIT PROTEIINIEN KATKAISUSSA	28
5.1 BIOMOLEKYYLIEN DEGRADAATIO.....	28
5.2 PROTEIINIEN SPESIFINEN KATKAISU	29
5.2.1 Kupari(II)ioni	29
5.2.2 Rautakelaatit	31

5.2.3	<i>Palladium(II)ioni</i>	33
5.3	YHTEENVETO KUPARI- JA RAUTAIONIEN OSALLISTUMISESTA PROTEIINIEN PILKKOUTUMISEEN.....	34
TUTKIMUSOSA		36
6	MATERIAALIT JA MENETELMÄT	36
6.1	MATERIAALIT	36
6.1.1	<i>Fuusioproteiinit</i>	36
6.1.2	<i>Fuusioproteiinien tuotto ja puhdistus</i>	37
6.1.3	<i>SDS-PAGE</i>	39
6.1.4	<i>Fuusioproteiinin peptidiketjun katkaisu vapaan kupari(II)ionin avulla</i>	40
6.1.5	<i>Geelisuodatus</i>	42
6.1.6	<i>Ioninvaihto</i>	43
6.1.7	<i>Massa-analyysi sekä N-terminaalinen sekvennointi</i>	44
6.2	MENETELMÄT	44
6.2.1	<i>Fuusioproteiinin tuotto ja puhdistus</i>	44
6.2.2	<i>SDS-PAGE</i>	47
6.2.3	<i>Fuusioproteiinin peptidiketjun katkaisu vapaan kupari(II)ionin avulla</i>	48
6.2.4	<i>Geelisuodatus</i>	50
6.2.5	<i>Ioninvaihto</i>	51
6.2.6	<i>Massa-analyysi sekä N-terminaalinen sekvennointi</i>	53
7	TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU	54
7.1	FUUSIOPROTEIININ TUOTTO JA PUHDISTUS	54
7.2	KATKAISUREAKTIOON JA SEN SPESIFISYYTEEN VAIKUTTAVAT TEKIJÄT.....	55
7.2.1	<i>Peptidilinkkerin koostumus</i>	55
7.2.2	<i>Reaktio-olosuhteet</i>	56
7.2.3	<i>Reaktiokomponenttien pitoisuudet</i>	60
7.2.4	<i>Parhaat olosuhteet</i>	63
7.2.5	<i>Kupari(II)ioni, askorbaatti ja vetyperoksidi -tehosteet</i>	64
7.3	KATKEAMISKOHTA	66
7.3.1	<i>Geelisuodatus</i>	66
7.3.2	<i>Ioninvaihto</i>	71
7.3.3	<i>Katkeamistuotteiden N-terminaalinen sekvenssi</i>	71
7.3.4	<i>Katkeamistuotteiden molekyylipaino</i>	72
8	JOHTOPÄÄTÖKSET	79
9	YHTEENVETO	82
10	JATKOTUTKIMUSEHDOTUKSET	84

11	KIRJALLISUUSLUETTELO	86
----	----------------------------	----

LIITTEET

Liite 1. Käytettyjen fuusioproteiinien aminohapposekvenssit

Liite 2. MALDI-kuvaajat MBP -katkaisutuotteille

Liite 3. MALDI-kuvaajat MBP-H6-SSO2 -proteiinin katkaisutuotteille

Liite 4. MALDI-kuvaaja puhtaalle MBP-H6-SSO2 -fuusioproteiinille

LYHENTEET

GST	glutationi-S-transferaasi
MBP	maltoosia sitova proteiini (engl. maltose binding protein)
GFP	vihreä fluorensioiva proteiini (engl. green fluorescent protein)
DTT	ditiotreitoli
TEV	tupakkakasvia syövyttävä virus (engl. tobacco etch virus)
EDTA	etyleenidiamiinitetraetikkahappo
CBD	kitiiniä sitova domeeni (engl. chitin binding domain)
SOD	superoksididismutaasi
Met	metioniini
Asp	asparagiini
Pro	proliini
Gly	glysiini
Trp	tryptofaani
Arg	arginiini
Lys	lysiini
Val	valiini
Ile	isoleusiini
Glu	glutamiinihappo
Phe	fenyylialaniini
His	histidiini
Leu	leusiini
Ser	seriini
Asn	asparagiini
Asp	asparagiinihappo
Tyr	tyrosiini
Gln	glutamiini
Cys	kysteiini
Thr	treoniini
SDS-PAGE	natriumdodekyylisulfaatti-polyakryylamidigeelielektroforeesi

AVI	streptavidiini
IPTG	isopropyli- β -D-tiogalaktopyranosidi
TCA	trikloorietikkahappo
DOC	natriumdeoksykolaatti
RPC	käänteisfaasikromatografia
TFA	trifluorietikkahappo

KIRJALLISUUSOSA

1 JOHDANTO

Useita bioteknisesti merkittäviä proteiineja tuotetaan fuusioproteiineina, jolloin voidaan esimerkiksi parantaa proteiinin liukoisuutta solun sisällä sekä helpottaa proteiinin puhdistusta ja detektiota. Fuusioparina käytetty proteiini voi häiritä halutun proteiinin toimintaa tai olla immunogeeninen, joten fuusiopari halutaan yleensä poistaa. Fuusioproteiineja voidaan katkaista halutusta kohdasta kemiallisilla reagensseilla tai entsyymaattisesti erilaisilla proteaaseilla. Kemialliset reagenssit vaativat kuitenkin proteiineille epäsuotuisat tai jopa tuhoiset olosuhteet ja proteaasien käyttö on kallista (Huphreys *et al.*, 1999).

Metalli-ionien ja etenkin kupari-ioninen ja rautakelaattien käyttömahdollisuudesta fuusioproteiinien katkaisussa on useita julkaisuja, mutta tulokset ovat kuitenkin olleet vaihtelevia. Rauta- ja kupari-ionit voivat katalysoida reaktiivisen hapen syntyä todennäköisesti Fentonkaltaisella kemialla. Metallionien sitoutuminen haluttuun kohtaan proteiinin rakennetta, Fentonkemian aktivointi ja proteiiniketjun pilkkoutuminen spesifisesti syntyvillä radikaaleilla on ollut usean tutkimusryhmän tavoitteena.

Tämän diplomityön tarkoituksena oli karakterisoida kupari-ionilla tehtävää fuusioproteiinin peptidilinkkerin katkaisureaktiota. Tarkoituksena oli tutkia peptidilinkkerin koostumuksen sekä reaktioolosuhteiden vaikutusta katkaisureaktioon sekä sen spesifisyyteen. Olosuhteita vaihtelemalla pyrittiin löytämään katkaisureaktiolle olosuhteet, joissa saavutetaan mahdollisimman hyvä spesifisyys riittävällä saannolla. Toisena tavoitteena oli määrittää fuusioproteiinin tarkka katkeamiskohta. Tarkoituksena oli puhdistaa, tunnistaa sekä karakterisoida katkaisutuotteet määrittämällä proteiinifragmenttien aminohapposekvenssi sekä molekyylipaino.

2 FUUSIOPROTEIINIT

Fuusioproteiinit ovat proteiineja, jossa kaksi tai useampia geenejä on yhdistetty samoihin lukuraameihin siten että translaatiossa syntyy vain yksi proteiini. Liittämällä halutun proteiinin joko N- tai C-terminaaliseen päähän jokin ennalta tunnettu proteiini tai peptidi voidaan parantaa proteiinin tuotannon kannalta merkittäviä ominaisuuksia ja helpottaa puhdistusprosessia (Madigan *et al.*, 2003).

Fuusioproteiinitekniikan avulla voidaan mahdollistaa heikkotuottoisten tai muuten epästabiilien proteiinien tuotto paremmassa tuotto-organismissa. Tuotto-organismitteille vieras proteiini voi olla isäntäsolulle toksinen ja tuotantokanta kuolee tai isäntäsolun proteaasit tuhoavat vieraan proteiinin ennen kuin se ehditään eristää (Madigan *et al.*, 2003). Yhdistämällä haluttuun proteiiniin jokin toinen proteiini, jonka tiedetään normaalisti olevan stabiili käytetyssä tuotto-organismissa, voidaan tuotettavan proteiinin stabiilisuutta parantaa (Kelley ja Winkler, 1990; LaVaille ja McCoy, 1995). Hydrofobisten proteiinien suuret tuottotasot puolestaan voivat aikaansaada inkluusiorakenteiden (engl. inclusion bodies) muodostumisen. Ne koostuvat pääosin väärin laskostuneista rekombinanttiproteiineista. Nämä inkluusiorakenteet on helppo puhdistaa suuren kokonsa vuoksi, mutta niitä voi olla hyvin vaikea tai mahdoton liuottaa edes denaturanttien, kuten guanidiinihydrokloridin, avulla. Fuusioimalla hydrofobinen inkluusioita muodostava proteiini hydrofiilisen proteiinin kanssa voidaan saada liukoisuusominaisuuksiltaan parempi proteiini (Bommarius ja Riebel, 2004; Madigan *et al.*, 2003).

Tavallisin fuusioproteiinitekniikan käyttösovellus on halutun proteiinin fuusioiminen helposti puhdistettavaan proteiiniin. Kun fuusiopartneriksi valitaan proteiini, joka on helppo, nopea ja halpa puhdistaa, saavutetaan merkittäviä taloudellisia sekä ajallisia etuja. Tällaisia proteiineja ovat esimerkiksi streptavidini, glutationi-S-transferaasi (GST) sekä maltoosia sitova proteiini (MBP). Kullekin näistä proteiineista on olemassa vastaava affiniteettimateriaali,

jolla puhdistuminen saavutetaan usein yhdessä puhdistusvaiheessa (LaVaille ja McCoy, 1995; Jenny *et al.*, 2003). Fuusioproteiinien affiniteettipuhdistuksessa voidaan käyttää hyödyksi monen tyyppisiä vuorovaikutuksia: entsyymi – substraatti, bakteerireseptori – seerumiproteiini, polyhistidiini – metalli-ioni ja vasta-aine – antigeeni (Nilsson *et al.*, 1997). Taulukossa 1 on esitetty yleisimmin käytettyjä fuusioproteiinipartnereita sekä näiden helpon puhdistuksen mahdollistavat ligandit affiniteettipuhdistuksessa.

Taulukko 1. Yleisimmät fuusioproteiineissa käytetyt proteiinit, niiden alkuperät, molekyylipainot sekä ligandit affiniteettipuhdistuksessa (Lottspeich ja Zorbas, 1998). APTG=p-aminofenyli-β-D-tiogalaktosidi, IgG = immunoglobuliini G (Da=g/mol).

Fuusioproteiini	Alkuperä	M (kDa)	Ligandi affiniteetti-puhdistuksessa
β-Galaktosidaasi	<i>Escherichia coli</i>	116	APTG
Proteiini A	<i>Staphylococcus aureus</i>	31	IgG
Streptavidini	<i>Streptomyces avidinii</i>	13	Biotiini
Glutathioni-S-trasferaasi	<i>Schistosoma japonicum</i>	26	Glutathioni
Maltoosia sitova proteiini	<i>Escherichia coli</i>	40	Tärkkelys
Inteini/kitiini domaini	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> / <i>Bacillus circulans</i>	55	Kitiini
Ubikitiini	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	8	-

Teollisuuden kannalta proteiinien puhdistusta helpottavia fuusioproteiinitekniikan sovelluksia ovat proteiinin isoelektrisen pisteen sekä erottumisominaisuuksien muuttaminen. Proteiinin isoelektristä pistettä voidaan muuttaa liittämällä haluttuun proteiiniin varauksellisia aminohappoja. Tämä voi mahdollistaa teollisuuden näkökulmasta helppokäyttöisen ioninvaihdon käytön proteiinin puhdistuksessa. Muuttamalla proteiinin erottumisominaisuuksia, voidaan mahdollistaa proteiinin teollisuuden kannalta helppo erotus kaksifaasiuutolla (Nygren *et al.*, 1994).

Liittämällä haluttu proteiini signaaliptidiin, voidaan proteiini saada erittymään johonkin tiettyyn solun osaan. Signaaliptidi voi mahdollistaa proteiinin kuljetuksen sytoplasmisen membraanin läpi, jolloin proteiini erittyy ulos tuottosolusta kasvatusliuokseen ja proteiinin puhdistaminen helpottuu. Gram-negatiivisilla bakteereilla, kuten *Escherichia coli*, signaaliptidin sisältävät fuusioproteiinit erittyvät solun periplasmiseen tilaan. *E. coli* -bakteerilla

solunsisäinen hapetuspelkistystasapaino on disulfidisidoksia pelkistävä, tällöin proteiinin erityis hapettavampaan periplasmiseen tilaan voi parantaa proteiinin oikeaa laskostumista eikä inklusiorakenteita synny niin helposti. Periplasmisessa tilassa ei ole myöskään niin paljon proteolyyttisiä entsyymejä kuin sytoplasmassa. Erityksen haittapuolena ovat yleisesti pienemmät tuottotasot verrattuna solunsisäisiin fuusioproteiineihin (Kelley ja Winkler, 1990).

Halutun proteiinin fuusioiminen antigeeniin voi mahdollistaa proteiinin detektion immunologisilla menetelmillä jopa ng/ml -pitoisuuksilla (Lindbladh, 1992). Myös halutun proteiinin fuusioiminen vihreään fluorensioivaan proteiiniin (GFP) mahdollistaa proteiinin helpon detektion. GFP:n fuusiot emittoivat kirkasta vihreää valoa pitkäaaltoisessa ultraviolettivalossa (LaVaille ja McCoy, 1995). Proteiiniin voidaan liittää myös kokonaan toinen toiminnallisuus. Tällöin voidaan luoda esimerkiksi terapeuttinen fuusioproteiini, jonka toinen osa toimii tunnistimena ja toinen vaikuttavana osana, kuten toksiinina syöpäsoluille (Park *et al.*, 2002).

Fuusioproteiinitekniikan tunnetuin teollinen sovellus on insuliinin tuotanto. Sokeritaudin hoitoon käytettyä insuliinia voidaan tuottaa fuusioproteiinina *E. coli* -bakteerissa. Tällöin insuliinin muodostavat A- ja B-ketjut tuotetaan erikseen fuusioituina β -galaktosidaasiin ja puhdistuksen jälkeen ketjut katkaistaan β -galaktosidaasista kemiallisesti syanogenibromidikäsittelyllä ja annetaan yhdistyä disulfidisilloilla insuliiniksi (Brown, 2001; Armstrong, 1989; Madigan *et al.*, 2003). Muita fuusioproteiinitekniikan teollisia sovelluksia ovat ihmisen kasvuhormonit: somatostatiini I ja II, sekä kateenkorvan hormoni: tymosiini alfa I (Brown, 2001; Armstrong, 1989).

3 FUUSIOPROTEIINIEN KATKAISU

Puhdistuksen jälkeen fuusioparina käytetty proteiini halutaan yleensä poistaa, koska se voi haitata halutun proteiinin toimintaa, haitata rakenteellista analyysiä tai olla immunogeeninen, mikäli kyseessä on terapeuttinen proteiini (Huphreys *et al.*, 1999). Fuusiopartnerin poistoon käytetään tavallisimmin joko entsymaattisia tai kemiallisia menetelmiä. Taulukossa 2 on esitetty tavallisimpia fuusioproteiinien katkaisuun käytettyjä kemiallisia yhdisteitä ja entsyymejä. Kemiallisista fuusioproteiinin katkaisumenetelmistä tavallisin on syanogeenibromidi, joka pilkkoo proteiinin metioniinitähteiden kohdalta. Entsymaattisista menetelmistä hyytymistekijä X ja trombiini ovat yleisimmin käytetyt. Molemmat pilkkovat proteiinin arginiinitähteen kohdalta.

Taulukko 2. Fuusioproteiinien spesifiseen katkaisuun käytettyjä kemiallisia ja entsymaattisia menetelmiä sekä spesifinen pilkkoutumiskohta (Sambrook ja Russel, 2001).

Katkaisumenetelmä	Katkaisukohdan sekvenssi
<i>Kemiallinen</i>	
Syanogeenibromidi ja 70 % muurahaishappo	-Met↓
Muurahaishappo (70%) ja lämmitys	-Asp↓Pro-
Hydroksyyliamiini ja lämmitys	-Asn↓Gly-
Jodobentsoehappo 2-(2-nitrofenyyli)-3-metyyli-3-bromoindeoliini 50 % etikkahapossa	-Trp↓
<i>Entsymaattinen</i>	
Klostripaiini	-Arg↓ ja -Lys-Arg↓
Kollagenaasi	-Pro-Val↓Gly-Pro-
Enterokinaasi	-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys↓
Hyytymistekijä X	-Ile-Glu(tai Asp)-Gly-Arg↓
Renniini	-Pro-Phe-His-Leu↓Leu-
Trombiini	-Leu-Val-Pro-Arg↓Gly-Ser-
Trypsiini	-Arg↓ tai -Lys↓
TEV proteaasi	-Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln↓Gly-

3.1 Entsymaattinen katkaisu

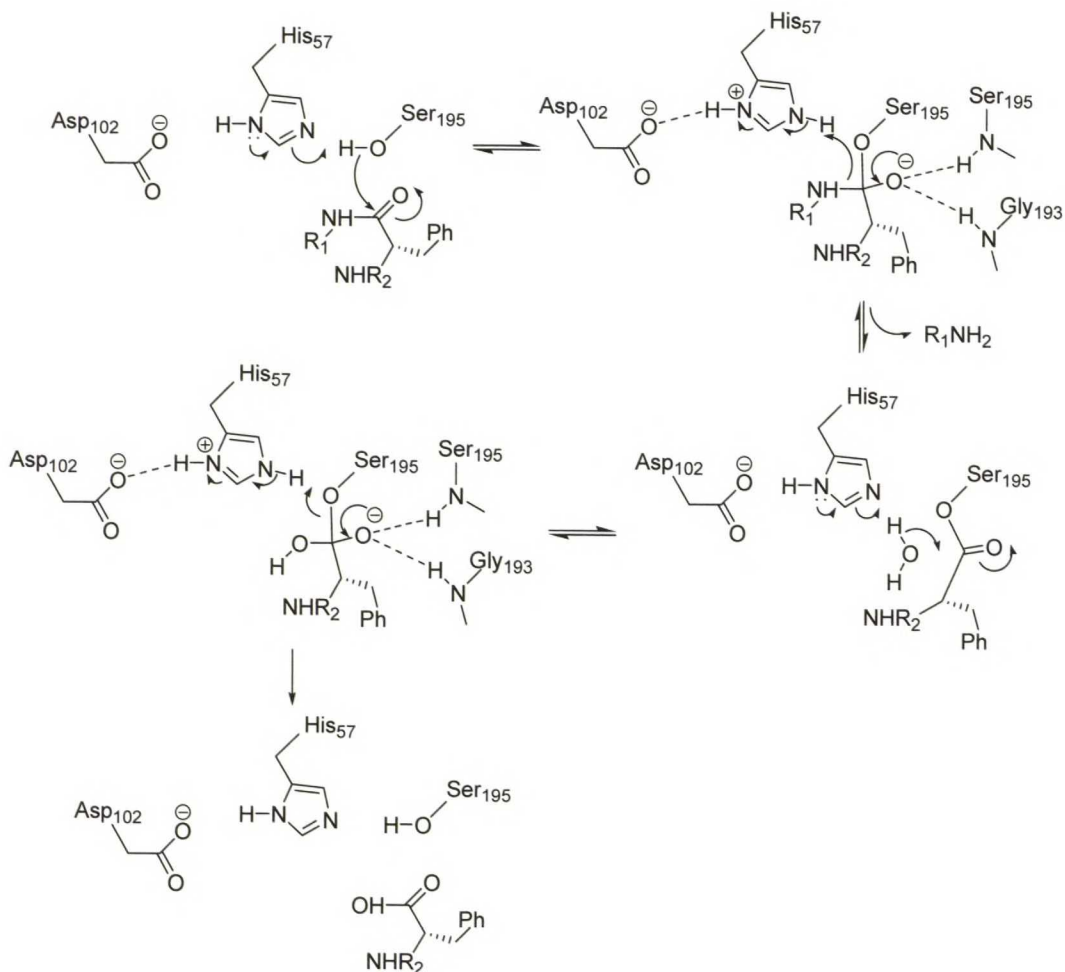
Fuusioproteiineja voidaan katkaista halutusta kohdasta entsyymaattisesti eri proteaaseilla. Proteaaseille on tyypillistä hyvä spesifisyys aina tiettyä aminohapposekvenssiä kohtaan. Fuusioproteiinia suunniteltaessa fuusiopartnereiden väliin laitetaan yleensä linkkerisekvenssi, joka vastaa halutun entsyymin tunnistamaa aminohapposekvenssiä (Lien *et al.*, 2001). Entsyymaattiset fuusioproteiinien katkaisumenetelmät ovat laboratorimittakaavassa suosittuja johtuen suhteellisen miedoista reaktio-olosuhteista ja erityisesti korkeasta spesifisyydestä. Useilla fuusioproteiinien katkaisuun käytetyillä entsyymeillä on hyvin pitkä substraatin tunnistusjakso, jopa 7 aminohappoa, mikä vähentää ei-haluttujen katkeamisen mahdollisuutta muualla proteiinissa (LaVaille *et al.*, 1994a).

Entsyymaattiseen fuusioproteiinin katkaisuun vaikuttavat useat tekijät. Puskurin valinta on tärkeä sekä pH:n että ionivahvuuden osalta. Reaktio-olosuhteet kuten entsyymin ja substraatin suhde, lämpötila sekä reaktion kesto vaikuttavat katkaisureaktion nopeuteen ja katkeamisen spesifisyyteen kuten myös kohdeproteiinin stabiilisuuteen. Reaktio-olosuhteiden optimointi kullekin proteiinille erikseen on välttämätöntä. Käytettävän entsyymin puhtaus on myös kriittinen tekijä (Jenny *et al.*, 2003).

Useat tällä hetkellä saatavilla olevat fuusioproteiinien katkaisuun tarkoitetut proteaasit ovat soveltumattomia teollisuuden käyttöön johtuen huonoista katkaisutasoista sekä suurista kuluista, joita niiden käytöstä aiheutuu (Lien *et al.*, 2001). Proteaasit ovat kalliita ja niiden käyttö vaatii yhden ylimääräisen puhdistusvaiheen proteolyyttisen entsyymin poistamiseksi tuotteesta. Proteaasien tehokkuus voi lisäksi olla huono johtuen katkaisukohdan ympäristön sekvenssieroista sekä katkaisukohdan steerisistä ahtaudesta suurille entsyymeille (Huphreys *et al.*, 1999).

3.1.1 Seriiniproteaasit

Markkinoilla olevat fuusioproteiinien katkaisuun soveltuvat entsyymit ovat lähes kaikki seriiniproteaaseja. Seeriiniproteaasit ovat proteaaseja joiden aktiivisessa keskuksessa on seriinitähde, joka osallistuu amidisidoshydrolyysin kovalenttiseen katalyysiin. Seriinitähden lisäksi katalyysiin osallistuu histidiini- ja aspartaattitähde. Näitä kolmea aminohappoa kutsutaan katalyyttiseksi triadiksi (Bugg, 2004). Kuvassa 1 on esitetty esimerkkinä seriiniproteaasin toimintamekanismista α -kymotrypsiinin reaktiomekanismi.



Kuva 1. α -Kymotrypsiinin reaktiomekanismi (Bugg, 2004). α -Kymotrypsiini on seriiniproteaaseihin kuuluva entsyymi, joka pilkkoo proteiinien amidisidoksia aromaattisten aminohappojen (Phe, Tyr, Trp) jälkeen. Fuusioproteiinien katkaisussa käytetyt entsyymit ovat yleensä seriiniproteaaseja, joiden katalyyttinen mekanismi on samanlainen kuin α -kymotrypsiinillä.

Kuvasta 1 nähdään, että α -kymotrypsiinin katalysoimassa reaktiossa aktiivisen keskuksen seriinitähde hyökkää amidin karbonyylihiileen muodostaen vetysidoksin stabiloidun tetrameerisen oksianionivälituotteen. Lähtevän typen protonoituminen johtaa asyylientsyymivälituotteen muodostumiseen. Tämän jälkeen histidiini toimii emäksenä ja ottaa protonin asyylientsyymivälituotteeseen hyökkäävältä vesimolekyyliltä, jolloin muodostuu toinen tetrameerinen oksianionivälituote. Lähtevän seriinitähteen hapen protonointi johtaa karboksyylihappotuotteen vapautumiseen ja katalyyttinen reaktio päättyy (Bugg, 2004).

3.1.2 Hyytymistekijä X ja trombiini

Hyytymistekijä X ja trombiini ovat fuusioproteiinin katkaisussa yleisimmin käytetyt entsyymit (Jenny *et al.*, 2003). Ne ovat naudan plasmasta eristettyjä, trypsiinin kaltaisia seriiniproteaaseja, jotka pilkkovat proteiinin emäksisen aminohapon, arginiinin tai lysiinin, karboksyylipäästä (Nagai ja Thøgersen, 1984; Bugg, 2004). Trypsiini pilkkoo kaikki arginiinin ja lysiinin jälkeiset peptidisidokset, mutta trombiini ja hyytymistekijä X ovat paljon spesifisempiä ja pilkkovat vain tietyt sidokset. Trypsiinin ja trombiinin/hyytymistekijä X:n erot johtuvat siitä että trypsiini on digestoiva proteaasi kun taas trombiini ja hyytymistekijä X ovat sääteleviä proteaaseja (Jenny *et al.*, 2003).

Fuusioproteiinin katkaisuun käytetyt olosuhteet hyytymistekijä X:llä ja trombiinilla ovat hyvin samanlaiset. Katkaisureaktio suoritetaan yleensä pH:ssa 8 yhden tai useamman suolan (CaCl₂, NaCl, ym.) läsnäollessa. Inkubointi suoritetaan 4-37 °C:een lämpötilassa muutamasta tunnista useampaan vuorokauteen. Katkaisu voidaan tehdä myös lievästi denaturoivissa olosuhteissa, kuten DTT:n, β -merkaptetanolin tai guanidiini-HCl:n läsnäollessa. Molempia entsyymejä on saatavilla kaupallisesti useilta yrityksiltä (Jenny *et al.*, 2003).

3.1.3 Enterokinaasi

Enterokinaasi on normaalisti nisäkkäiden suolistossa esiintyvä entsyymi, joka katalysoi trypsinogeenin muuttumista aktiiviseksi trypsiiniksi, katkaisemalla yhden peptidisidoksen läheltä proentsyymin N-terminaalista päätä (Anon., 2004a). Enterokinaasi on seriiniproteaasi, joka tunnistaa viiden aminohapon sekvenssin, Asp-Asp-Asp-Asp-Lys, ja katkaisee peptidiketjun tämän karboksyylipäästä (Hosfield ja Lu, 1999). Enterokinaasia voidaan käyttää fuusioproteiinien katkaisuun hyvin laajoissa olosuhteissa. Katkaisureaktio voidaan tehdä pH:ssa 4,5–9,5 ja lämpötilassa 4–45 °C. Tyypillisesti katkaisureaktio tehdään 37 °C:een lämpötilassa 16–24 h inkubointiajalla (LaVaille *et al.*, 1994b).

3.1.4 TEV proteaasi

TEV (engl. tobacco etch virus) NIa (engl. nuclear inclusion a) proteaasi on 27 kDa:a suuri tupakkakasvia syövyttävän viruksen proteaasi, jota voidaan käyttää fuusioproteiinien katkaisussa. Se tunnistaa seitsemän aminohapon sarjan, Glu-X-X-Tyr-X-Gln↓Ser/Gly, jossa X voi olla vaihteleva aminohappo, ja katkaisee peptidiketjun glutamiinin ja seriinin tai glysiinin välistä. (Parks *et al.*, 1994). TEV proteaasi katkaisee fuusioproteiinin pitkästä tunnistussekvenssistä johtuen hyvin spesifisesti ja se toimii hyvin myös matalissa lämpötiloissa (Sambrook ja Russel, 2001). TEV proteaasi on aktiivinen maksimissaan 34 °C:een lämpötilassa. Katkaisureaktio TEV proteaasilla tehdään tyypillisesti pH:ssa 8, pienessä EDTA ja DTT -pitoisuudessa ja näytettä inkuboidaan yön yli (Maier ja Jessen, 2004). Myös TEV proteaasia on saatavana kaupallisesti fuusioproteiininä. Tällöin siihen on kiinnitetty polyhistidiinitunniste, joka mahdollistaa proteaasin yksinkertaisen poiston katkaisun jälkeen (Sambrook ja Russel, 2001; Parks *et al.*, 1994).

TEV proteaasin entsymaattinen mekanismi on hyvin samanlainen kuin seriiniproteaasien. Kuten seriiniproteaasit, TEV proteaasi käyttää katalyyttistä triadia, joka katalysoi peptidiketjun hydrolyysiä. TEV proteaasissa tavanomaisen Ser-Asp-His -triadin seriininukleofiili on kuitenkin korvattu kysteiinillä

(Waugh, 2004). Koska TEV proteaasi käyttää katalyyttistä triadia, se voidaan lukea kuuluvaksi seriiniproteaaseihin (Parks *et al.*, 1994). Proteaasit, joilla on aktiivisessa keskuksessa hydrolyysiin kovalenttisesti osallistuva kysteiinitähde, luokitellaan yleensä tioliproteaaseiksi (Bugg, 2004), josta johtuen TEV proteaasi voidaan lukea kuuluvaksi myös tioliproteaaseihin (Maier ja Jessen, 2004).

TEV proteaasi on hyvin kestävä useimpia proteaasi-inhibiittoreita vastaan ja. bakteerikasvatuksissa normaalisti käytetyt proteaasi-inhibiittorit eivät juuri vaikuta sen aktiivisuuteen (Sambrook ja Russel, 2001). Koska TEV proteaasin aktiivisessa keskuksessa on seriinitähden sijaan kysteiinitähde, eivät useimmat seriiniproteaasi-inhibiittorit vaikuta sen toimintaan (Waugh, 2004). Kysteiinitähdestä johtuen useat tiolireagenssit, kuten jodoasetamidi, puolestaan inhiboivat TEV proteaasia (Maier ja Jessen, 2004).

3.2 Kemiallinen katkaisu

Fuusioproteiinin kemialliset katkaisumenetelmät perustuvat yleensä kohdeproteiinin happo- tai emässtabiilisuuteen (Bommarius ja Riebel, 2004). Yleisimpiä fuusioproteiinien kemiallisessa katkaisussa käytettyjä kemikaaleja ovat syanogeenibromidi, hydroksyyliamiini, formaliini sekä vahvat hapot.

Kemiallisilla katkaisumenetelmillä on useita haittapuolia. Kemiallinen katkaisu vaatii lähes aina proteiineille epäsuotuisat tai jopa tuhoisat olosuhteet, kuten korkean lämpötilan tai hyvin korkean tai hyvin matalan pH:n ja suuren mooliylimäärän (Milović ja Kostić, 2003). Epäsuotuisat olosuhteet voivat aikaansaada proteiinin aggregoitumista, saostumista tai sivureaktioita, kuten aminohappojen sivuketjujen ei-toivottuja reaktioita, jotka voivat vaikuttaa proteiinin aktiivisuuteen ja laskostumiseen. Tällaiset tapahtumat voivat tuhota halutun proteiinin ja koko katkaisutuotteen käyttö voi olla mahdotonta. Kemiallisen katkaisun spesifisyys on usein rajoittunut yhteen aminohappoon, joka vaikeuttaa kemiallisten katkaisumenetelmien käyttöä spesifisessä katkaisussa.

Kemiallisten katkaisumenetelmien käyttö edellyttää myös työskentelyä vaarallisten kemikaalien, kuten syanogeenibromidi ja hydroksyyliamiini, kanssa. Erityistä huolellisuutta täytyy kiinnittää näiden kemikaalien säilytykseen, käyttöön sekä hävitykseen (LaVaille *et al.*, 1994b).

Joskus kemialliset katkaisumenetelmät ovat haitoistaan huolimatta hyödyllisiä ja ehkä ainoitakin käyttökelpoisia menetelmiä. Kemiallisilla katkaisumenetelmillä voidaan tehdä katkaisu denaturoivissa olosuhteissa muuten liukenemattomille fuusioproteiineille tai mikäli katkaisukohta on proteiinin laskostuneessa muodossa steerisesti estynyt. Kemiallinen katkaisu on myös erittäin halpa ja tehokas menetelmä ja käytettävät reagenssit ovat puhtaita ja niitä on helposti saatavissa (LaVaille *et al.*, 1994b).

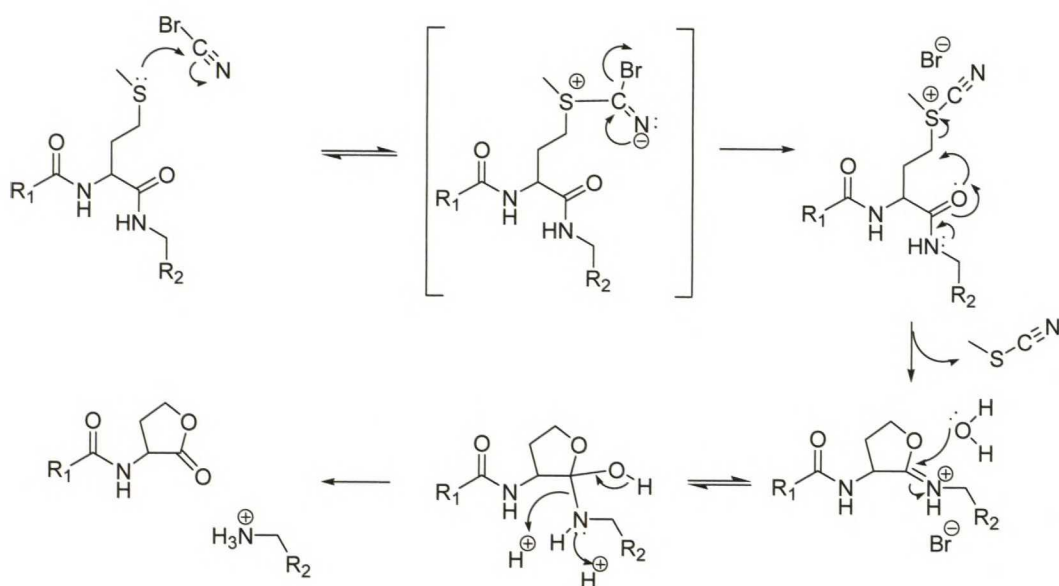
3.2.1 Syanogeenibromidi

Syanogeenibromidia on käytetty pilkkomaan fuusioproteiineja jo useiden vuosien ajan. Syanogeenibromidin käyttö teollisesti somatostatiinin tuotossa keksittiin jo vuonna 1977 ja insuliinin tuotossa vuonna 1981 (LaVaille *et al.*, 1994b). Syanogeenibromidi pilkkoo peptidisidoksen metioniinitähteiden karboksyylipäästä. Menetelmä on käyttökelpoinen vain, mikäli kohdeproteiinin sekvenssissä ei ole metioniiniaminohappoja. Tämä asettaa rajoituksia käyttökohteille.

Syanogeenibromidilla tehtävä fuusioproteiinien katkaisureaktio tehdään yleensä matalassa pH:ssa 70 % muurahaishapossa ja suuressa mooliylimäärässä syanogeenibromidia. Reaktioliuosta inkuboidaan yleensä muutamasta tunnista vuorokauteen 0–45 °C:een lämpötilassa. Katkaisu on yleensä tehokas, mutta muutokset sivuketjuissa, kuten proteiinin disulfidisiltojen pelkistymiset, ja epäspesifiset katkeamiset voivat olla yleisiä pitkillä inkubointiajoilla matalassa pH:ssa (LaVaille *et al.*, 1994b). Muurahaishappo voidaan toisinaan korvata guanidiinihydrokloridilla, jolloin vältetään disulfidisiltojen pelkistymiseltä ja

proteiini säilyy useammin toiminnallisena (Villa *et al.*, 1989; LaVaille *et al.*, 1994b).

Syanogeenibromidin peptidisidoshydrolyysin mekanismi on esitetty kuvassa 2. Mekanismissa metioniinitähteen rikki hyökkää syanogeenibromidin syanoryhmään ja muodostuu syanosulfoniumibromidi -suola. Seuraavassa vaiheessa reaktiossa muodostuu syklinen iminolaktonibromidi ja metyyllitosyanaattia vapautuu. Edelleen vesimolekyylin hyökkäyksen seurauksena C-terminaalinen katkeamistuote saadaan talteen normaalina peptidinä, jonka N-terminuksessa on aminoryhmä. N-terminaalinen katkeamistuote sisältää homoseriinilaktoniryhmän peptidin C-terminuksessa (Gross, 1967).



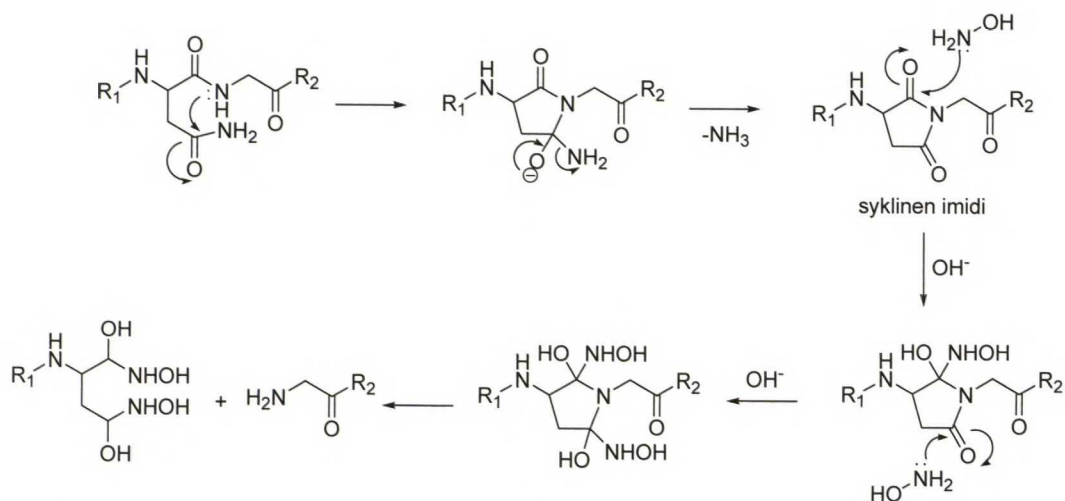
Kuva 2. Syanogeenibromidihydrolyysin reaktiomekanismi (Anon, 2004c; Gross, 1967). Syanogeenibromidi hydrolysoi proteiinien peptidisidoksia metioniinitähteen karboksyylipestä, jolloin sitä voidaan käyttää fuusioproteiinien kemiallisena katkaisumenetelmänä.

3.2.2 Hydroksyyliamiini

Hydroksyyliamiini pilkkoo proteiineja Asn-Gly -sidosten kohdalta. Reaktio tehdään hyvin emäksisissä olosuhteissa, pH:ssa 9,5, ja reaktioliuosta inkuboidaan 45 °C:ssa muutamasta tunnista vuorokauteen. Erittäin emäksiset olosuhteet

saattavat aiheuttaa muutoksia joihinkin aminohappojen sivuketjuihin ja menetelmän saanto voi olla usein huono. Fuusioproteiinin katkaisu hydroksyyliamiinilla on kuitenkin nopea ja halpa menetelmä ja sillä on mahdollista tehdä proteiinin katkaisu denaturoivissa olosuhteissa muuten liukenemattomille fuusioproteiineille (LaVaille *et al.*, 1994b; Antorini *et al.*, 1997; Park *et al.*, 2001).

Hydroksyyliamiinin peptidisidoshydrolyysin reaktiomekanismi on esitetty kuvassa 3. Ensimmäisessä vaiheessa hydroksyyliamiinin vaikutuksesta tapahtuu asparagiini- ja glysiiniaminohappotähteiden uudelleenjärjestäytyminen. Syklinen imidi -välituote muodostuu ja vapautuu ammoniakkia. Hydroksyyliamiinin kaksivaiheinen nukleofiilinen hyökkäys imidirenkaaseen johtaa Asn-Gly -sidoksen hydrolyysiin (Antorini *et al.*, 1997; Bornstein ja Ballian, 1977).



Kuva 3. Hydroksyyliamiinin peptidisidoshydrolyysin reaktiomekanismi (Bornstein ja Ballian, 1977). Hydroksyyliamiini pilkkoo proteiineja asparagiini- ja glysiinitähteiden välistä. Hydroksyyliamiinia voidaan käyttää fuusioproteiinin spesifisessä katkaisussa.

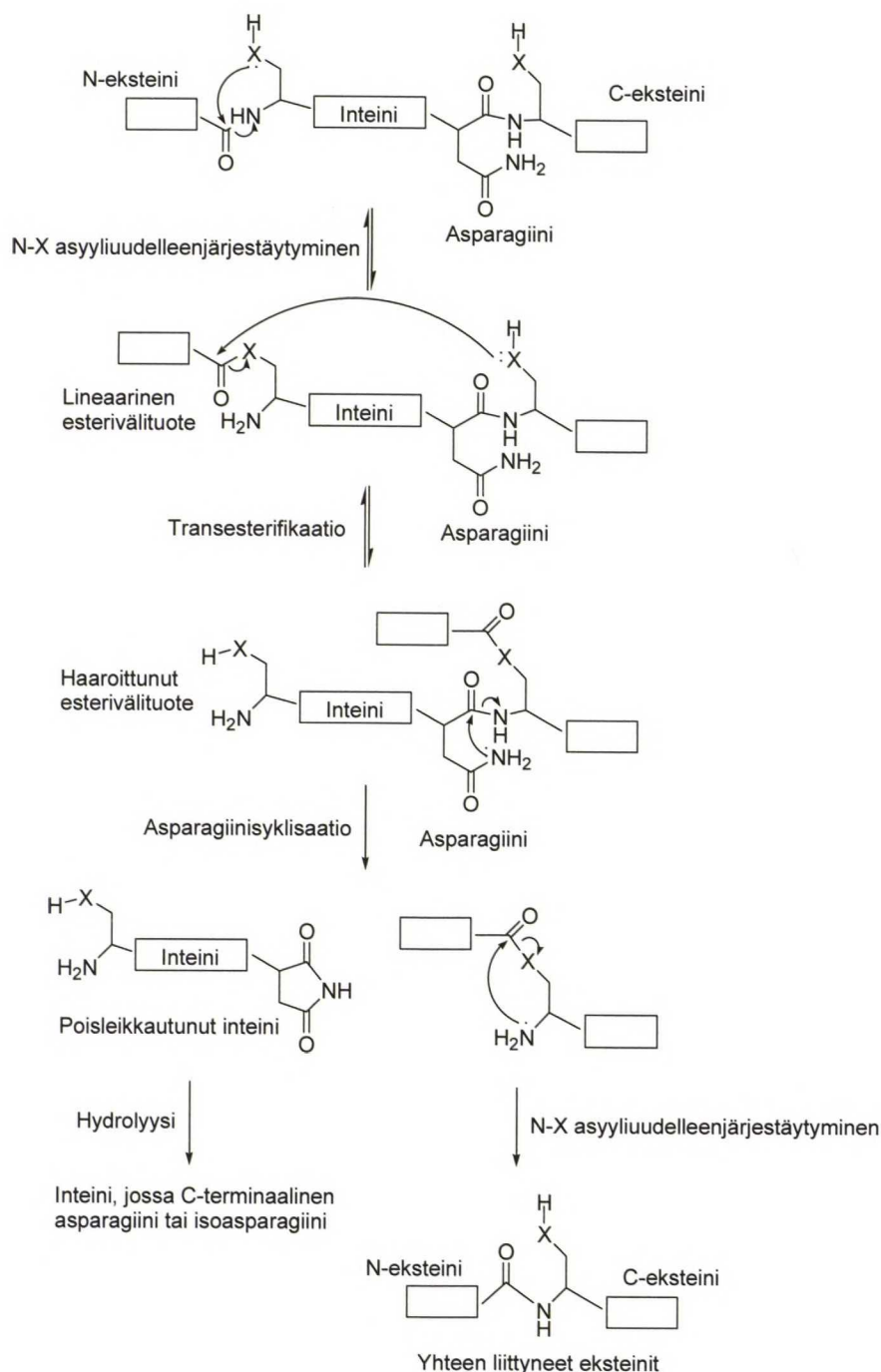
3.2.3 Hapot

Fuusioproteiineja on mahdollista katkaista kemiallisesti hydrolyysillä alhaisessa pH:ssa. Menetelmä perustuu Asp-Pro -sidoksen labiilisuuteen matalassa pH:ssa. Tämän sidoksen hydrolyysi tapahtuu kohotetussa lämpötilassa (37–40 °C) ja

happamassa pH:ssa (2,5), joka saadaan aikaan käyttämällä muurahaishappoa ja etikkahappoa. Reaktioaika voi olla muutamasta tunnista jopa kolmeen vuorokauteen. Pitkillä inkubointiajoilla voi esiintyä epäspesifisiä reaktioita ja reaktio-olosuhteiden ollessa rajut proteiinin muutokset tai denaturoituminen ovat mahdollisia. Menetelmää voidaan käyttää katkaisemaan muuten liukenemattomia fuusioproteiineja esimerkiksi guanidiinihydrokloridin läsnäollessa (LaVaille *et al.*, 1994b).

3.3 Itsekatkaisu

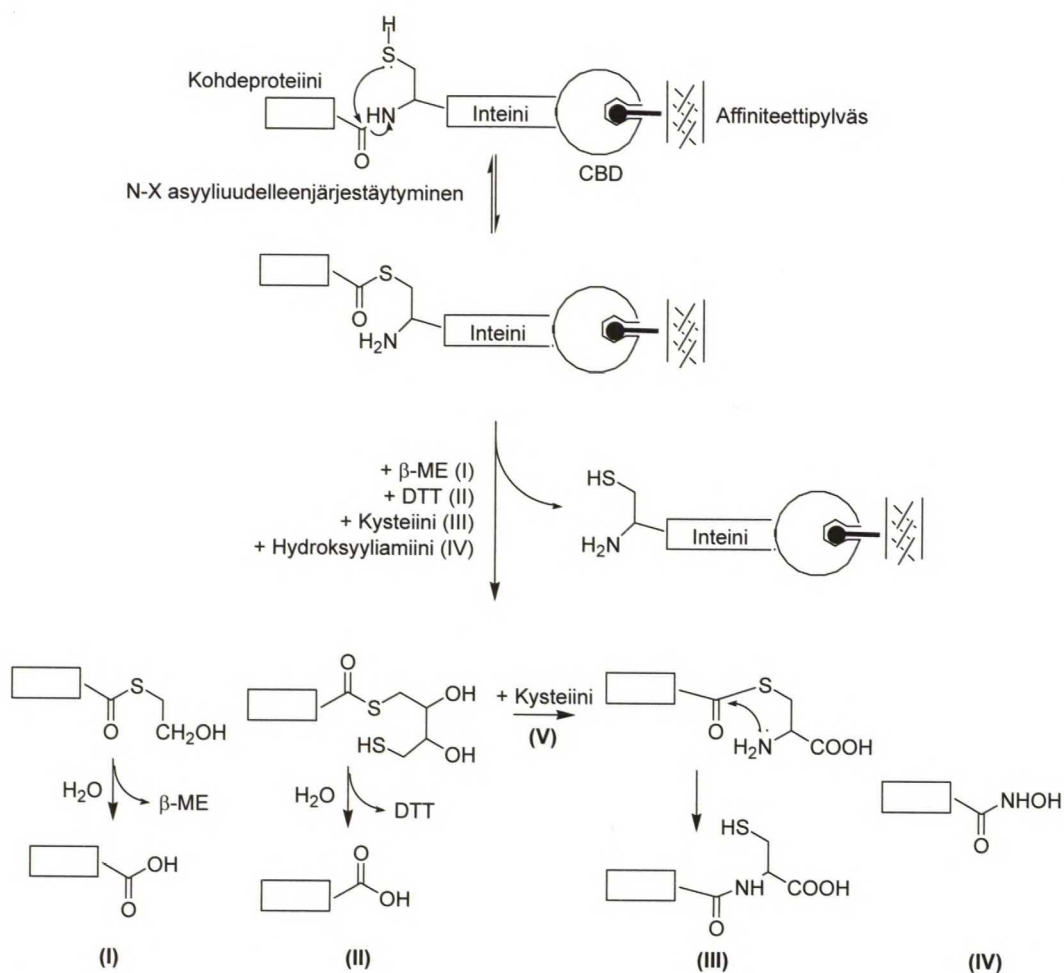
Proteiinin ketjutus (engl. protein splicing) on translaation jälkeinen muutos, jossa proteiinin sisäinen segmentti, inteini, voi katalysoida oman poisleikkautumisensa proteiinin prekursorista ja samalla sitoa sitä reunustaneet segmentit, eksteinit, yhteen muodostaen valmiin proteiinin (Chong *et al.*, 1997). Kuvassa 4 on esitetty proteiinin ketjuttumismekanismi. Ketjuttumisreaktio koostuu neljästä reaktiovaiheesta: N-X-asyyliuudelleenjärjestäytymisestä, transesterifikaatiosta, asparagiinisyklisaatiosta ja toisesta N-X-asyyliuudelleenjärjestäytymisestä. Ensimmäisessä vaiheessa inteinin aminotermiinalinen seriini- tai kysteiinitähde uudelleenjärjestäytyy muodostaen lineaarisen esterivälituotteen. Toisessa vaiheessa C-termiinalisen eksteinin seriini, kysteiini tai treoniini katkaisee transesterifikaatioreaktiolla edellisessä vaiheessa muodostuneen esterisidoksen. Kolmannessa vaiheessa inteinin C-termiinalinen asparagiini syklisoituu ja haaroittunut esterivälituote hajoaa kahtia. Viimeisessä vaiheessa eksteinien välinen peptidisidos muodostuu toisen N-X-asyyliuudelleenjärjestäytymisen seurauksena ja irronneen inteinin C-termiinalinen pää hydrolysoituu asparagiiniksi tai isoasparagiiniksi (Perler *et al.*, 1997).



Kuva 4. Proteiinin ketjuttumismekanismi (Perler *et al.*, 1997; Poland *et al.*, 2000). Proteiini ketjuttumisessa proteiini esiasteessa oleva inteinisegmentti leikkautuu spontaanisti pois ja sitä reunustaneet eksteinit liittyvät yhteen muodostaen valmiin proteiinin. Proteiinin ketjuttumisreaktio koostuu neljästä vaiheesta: N-X-asyliudelleenjärjestäytymisestä, transesterifikaatiosta, asparagiinisyklisaatiosta ja toisesta N-X-asyliudelleenjärjestäytymisestä. Reaktiivisen seriinin, treoniinin tai kysteiinin happi- tai rikkiatomi on merkitty X:llä.

Proteiinien itsepilkkoutumisominaisuutta voidaan hyödyntää fuusioproteiineissa. Tämä on esitetty kuvassa 5. Haluttu proteiini fuusiodaan muokatun inteinin

N-terminukseen. Inteinin C-terminus puolestaan fuusioidaan affiniteettitunnisteeseen, kuten kitiiniä sitovaan domeeniin (CBD). Fuusioproteiini puhdistetaan affiniteettikromatografialla, jolloin fuusioproteiinit kiinnittyvät pylvääseen affiniteettitunnisteensa avulla. Inteini aktivoidaan lisäämällä tiolia sisältävää kemiallista reagenssia, kuten β -merkaptetaanolia, DTT:a, kysteiiniä tai hydroksyyliamiinia. Tällöin inteini pilkkoutuu N-terminaalista päästään ja haluttu proteiini eluoituu ulos pylväästä. Muuttamalla inteinin C-terminuksen asparagiini alaniiniksi sen C-terminaalinen ketjuttumis- ja katkaisuaktiivisuus on saatu inaktivoitua ja inteini pysyy kiinni affiniteettitunnisteessa (Chong *et al.*, 1997; Bommarius ja Riebel, 2004).



Kuva 5. Proteiinin itsepilkkoutumisominaisuuden käyttö fuusioproteiineissa (Chong *et al.*, 1997). Haluttu proteiini fuusioidaan muokattuun inteiniin, joka puolestaan fuusioidaan affiniteettitunnisteeseen (CBD). Puhdistettaessa fuusioproteiinia affiniteettikromatografialla, tarttuvat fuusioproteiinit affiniteettitunnisteensa avulla pylvääseen. Inteini aktivoidaan lisäämällä tiolia sisältävää reagenssia, jolloin haluttu proteiini irtaantuu ja eluoituu pylväästä. CBD= kitiiniä sitova domaini, β -ME= β -merkaptetaanoli, DTT=ditiotreitoli.

4 KUPARI-IONIN ROOLI LUONNOSSA

Kupari on punaruskea siirtymämetalli, joka kuuluu myös jalometallien ryhmään yhdessä kullan ja hopean kanssa. Kupari on erittäin hyvä sähkön- ja lämmönjohde ja sillä on hyvä korroosion kestävyys ja hyvät muokattavuus ja työstettävyys ominaisuudet. Näiden ominaisuuksien vuoksi kuparia käytetään paljon putkistoissa sekä elektroniikkateollisuudessa. Kuparin lejeeringeillä, pronssilla ja messingillä, on myös tärkeä asema teollisuudessa. Yhdisteissä kupari esiintyy yleisesti hapetusluvulla +1 ja +2, mutta myös hapetusluvut +3 ja +4 esiintyvät joissain koordinaatoyhdisteissä. Kuparin yhdisteet ovat usein värillisiä (kuten sininen ja sinivihreä) ja sillä on taipumusta muodostaa kompleksisia ioneja (Fabian, 1986).

Kuparin tärkein biokemiallinen rooli on avustaa hapetus-pelkistysreaktioissa, joissa on mukana happea tai happiradikaaleja (Linder ja Hazegh-Azam, 1996). Kupari-ionit muuttuvat helposti toisikseen elektronin lisäyksen tai vapautumisen seurauksena ja kupari-ionit toimivat soluissa elektronien luovuttajina ja vastaanottajina. Kupari on tehokas katalyytti ja toimiessaan osana proteiinia sen katalyyttinen aktiivisuus lisääntyy ja muuttuu spesifisemmäksi. Myös kuparin kyky muodostaa stabiileja kelaatteja biologisten yhdisteiden kanssa on tärkeä ominaisuus luonnossa (Frieden, 1968).

4.1 Kuparin rooli ihmiskehossa

Aikuinen ihminen sisältää n. 100 mg kuparia (Frieden, 1968). Suurin osa elävien organismien, myös ihmisten, sisältämästä kuparista toimii kofaktorina tietyissä entsyymeissä ja elektronien kuljetusketjun proteiineissa, jotka osallistuvat energia- tai antioksidanttimetaboliaan. Ihmisissä ja muissa nisäkkäissä tärkeimmät proteiinit, joissa kuparilla on erityinen rooli, ovat seruloplasmiini (tärkeä stressiproteiini tulehduksessa sekä plasman kuljetusproteiini), sytokromioksidaasi

(soluhengitysketjun viimeinen entsyymi), superoksididismutaasi (SOD; torjuu happiradikaaleja) ja metallotioniini (varastoi ylimääräisen kuparin sekä torjuu happiradikaaleja) (Linder ja Hazegh-Azam, 1996). Näiden kuparista riippuvaisten entsyymien tehtävät jo itsessään kertovat että kupari on perusedellytys tämän laatuiselelle elämälle.

Kuparimetabolian muutokset ja puutteet aiheuttavat ihmisessä ja muissa nisäkkäissä sairauksia. Muutokset kuparin absorptiossa, kuljetuksessa, metaboliassa tai erityksessä ovat todennäköisesti yhteydessä tulehdukseen, syöpään, valtimoiden kovettumiseen ja anemiaan. Kuparin ylikuorma elimistössä (Wilsonin tauti) aiheuttaa maksakirroosia ja aivovauriota sekä kuparin vajaavaisuus (Menken syndrooma) kalpeutta, hiusten harmautta, neurologisia kehityshäiriöitä ja yleensä kuoleman lapsuusiässä (Linder ja Hazegh-Azam, 1996).

4.2 Kupariproteiinit

Kupari-ioni on potentiaalisesti vaarallinen ioni soluissa sen radikaalien muodostamiskyvyn takia, mutta kupari-ionien ominaisuus muuttua helposti toisikseen ja toimia elektronin luovuttajana tai vastaanottajana on elolliselle luonnolle elintärkeä ominaisuus. Useat kupariproteiinit ehkäisevät tutkimusosassa kuvatus kaltaista kupari(II)ionin aiheuttamaa proteiinin pillkoutumisreaktiota tapahtumasta *in vivo*. Kupariproteiineilla on tärkeä rooli luonnossa kupari-ionin potentiaalisen vaarallisuuden ehkäisijöinä sekä kuparin katalyyttisen aktivisuuden valjastajina. Tässä luvussa on kerrottu tärkeimmistä kuparia sisältävistä proteiineista ja entsyymeistä sekä näiden tehtävistä organismeissa.

Kuparin tehtävät proteiineissa vaihtelevat elektronin siirrosta hapen kuljetukseen ja aktiiviseen kemiaan, kuten hapen liittämiseen substraattiin. Kupariproteiinit on luokiteltu ryhmiin I, II ja III niiden spektroskooppisten ominaisuuksien perusteella. Tyypin I kupariproteiineille on tunnusomaista erittäin voimakas

absorbanssi aallonpituudella 600 nm. Tyypin I kupari tai 'sininen kupari' esiintyy sinisissä elektroneja kuljettavissa proteiineissa, kuten plastosyaniini ja atsuriini. Tyypin II kuparit tai 'värittömät kuparit' osallistuvat kemialliseen reaktiivisuuteen ja niitä esiintyy mm. superoksididismutaasissa ja galaktoosioksidaasissa. Tyypin III kuparille on tunnusomaista kupariparin antiferromagneettinen pariutuminen sekä voimakas absorbanssi aallonpituudella 330 nm. (Adman, 1991; Dugas, 1999). Taulukossa 3 on esitetty joitakin kuparia sisältäviä proteiineja, näiden luonnolliset lähdeorganismit sekä tehtävät lähdeorganismissa.

Taulukko 3. Kuparia sisältäviä proteiineja sekä niiden alkuperät ja tehtävät (Adman, 1991). Kupariproteiinit on luokiteltu ryhmiin niiden sisältämien kupari-ionien spektroskooppisten ominaisuuksien perusteella. Kupariproteiineja esiintyy kaikissa organismeissa kasveista ja mikrobeista ihmisiin.

Kuparia sisältävä proteiini	Tehtävä	Lähde
Tyypin I kupari		
Atsuriini	Elektronin siirto	Bakteerit
Plastosyaniini		Kasvit, levät
Pseudoatsuriini		Typipibakteerit
Tyypin II kupari		
Superoksididismutaasi	Superoksidiradikaalin poisto	Hiivat, nisäkkäät
Galaktoosioksidaasi	Alkoholioksidaasi	Sienet
Lysiinioksidaasi	Yhdistävien kudosten biosynteesi	Nisäkkäät
Tyypin III kupari		
Hemosyaniini	O ₂ -kuljetus	Niveljalkaiset, nilviäiset
Tyrosinaasi	Melaniinin synteesi	Sienet, nisäkkäät
Useita kuparityyppejä		
Askorbaattioksidaasi	O ₂ -> H ₂ O	Kasvit
Seruloplasmiini		Selkärangaiset
Lakkaasi		Sienet, kasvit
Sytokromioksidaasi		Bakteerit, selkärangaiset
Muut		
Kuparitioneiniini	Kuparihomeostaasi	Selkärangaiset
Hyytymistekijä V	Veren hyytyminen	Ihmiset

4.2.1 Tyrosinaasi

Tyrosinaasi (monofenolimono-oksygenaasi; EC 1.14.18.1) on entsyymi, joka vastaa melaniinipigmentin muodostuksesta. Melaniinista aiheutuvat ihon, hiusten sekä silmien väri ja se suojaa ihoa auringon ultraviolettisäteilyltä. Tyrosinaasin inaktiivisuus tai puuttuminen kokonaan aiheuttaa ihmisillä ja muilla nisäkkäillä

albinismia. Melaniinipigmentin puuttuminen hiuksista, iholta ja silmistä aiheuttaa kosmeettisen haitan lisäksi silmien herkkyyttä valolle, ihon herkkyyttä auringonpolttamille sekä eliniän lyhenemistä yleensä. Tyrosinaasin yliaktiivisuutta esiintyy pahanlaatuisissa ihosyövässä (Frieden, 1968). Tyrosinaasia esiintyy nisäkkäiden ohella myös kasveissa, sienissä ja bakteereissa. Tyrosinaasin katalysoimasta melaniinin muodostumisesta johtuvat mm. hedelmien tummentumisreaktiot (Adman, 1991).

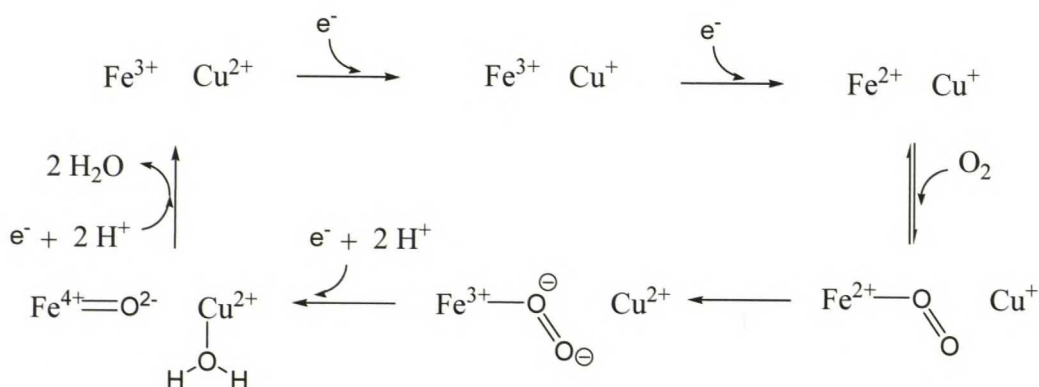
Tyrosinaasit koostuvat yhdestä, kahdesta tai neljästä alayksiköstä, joissa on tyyppin III binukleaarinen kupariryhmittymä. Nisäkkäillä monomeerinen 67 kDa tyrosinaasi katalysoi tyrosiinin aromaattisten hiilien m-hydroksylaatiota sekä m- ja p-hapettumista. Tällöin muodostuu dopakinoni, joka polymerisoituu spontaanisti. Kupari sitoutuu myös melaniinipolymeeriin (Linder ja Hazegh-Azam, 1996).

4.2.2 Sytokromioksidaasi

Sytokromioksidaasi (EC 1.9.3.1) on soluhengityksen viimeinen entsyymi mitokondrioissa ja bakteerien solumembraaneissa. Se on entsyymi joka löytyy lähes kaikilta organismeilta hieman erimuotoisena. Nisäkkäiden, mukaan lukien ihmisen, sytokromioksidaasi on kooltaan noin 200 kDa. Sytokromioksidaasi katalysoi elektronien siirtoa sytokromi c:ltä happimolekyyliille, joka pelkistyy kahdeksi vesimolekyyliksi. Tähän tarvittavat neljä elektronia saadaan sitruunahappokierrosta sytokromi c:n kautta ja samanaikaisesti protoneja pumppautuu sisemmän mitokondrionaalisen membraanin sisäpuolelle. Sytokromioksidaasissa elektronien kuljetukseen osallistuu kaksi rautakeskusta ja kaksi kupariatomia. (Linder ja Hazegh-Azam, 1996).

Kuvassa 6 on esitetty sytokromioksidaasin elektroninsiirtoketju. Aluksi täysin hapettuneet kupari(II)- ja rauta(III)ionit pelkistyvät kahden elektronin vaikutuksesta kupari(I)- ja rauta(II)ioneiksi. Täysin pelkistynyt rautaioni sitoo happimolekyylin, joka ottaa elektronin molemmilta ioneilta ja muodostuu

peroksidiväliaine. Elektronin ja kahden protonin vaikutuksesta peroksidi katkeaa ja O^{2-} on sitoutuneena rauta(IV)ioniin ja toinen happi on sitoutuneena kupari(II)ioniin vesimolekyylinä. Neljännen elektronin ja kahden lisäprotonin vaikutuksesta kaksi vesimolekyyliä vapautuu ja rauta(IV)ioni pelkistyy takaisin rauta(III)ioniksi (Stryer, 2000).



Kuva 6. Sytokromioksidaasin elektroninsiirtoketjun mekanismi (Stryer, 2000). Sytokromioksidaasin elektroninsiirtoketjuun osallistuu kaksi rautakeskusta ja kaksi kupari-iona. Sytokromioksidaasi katalysoi neljän elektronin siirtoa sitruunahappokierrosta sytokromi c:n kautta happimolekyyli. Tällöin happimolekyyli pelkistyy kahdeksi vesimolekyyliksi ja samanaikaisesti neljä protonia pumppautuu sisemmän mitokondriaalisen membraanin läpi.

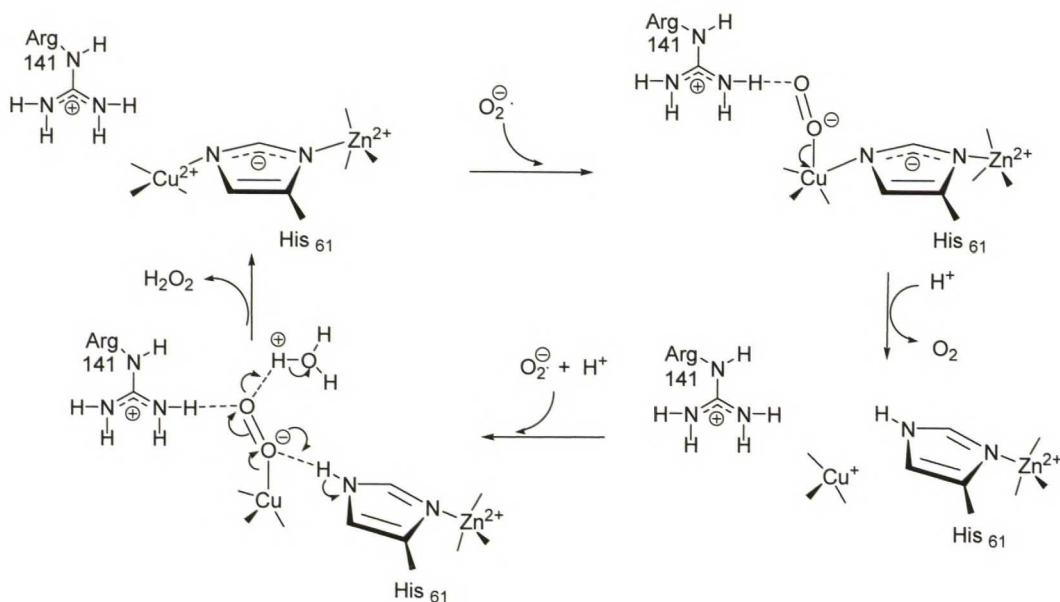
Neljän elektronin siirtyminen tuottaa turvallisia tuotteita (kaksi vesimolekyyliä), mutta hapen osittainen pelkistyminen tuottaa vaarallisia yhdisteitä, superoksidianioneja (O_2^-), jotka ovat elimistölle tuhoisia molekyylejä korkean reaktiivisuutensa takia. Sytokromioksidaasi sitoo happimolekyylin tiukasti rauta ja kupari-ionien väliin, jottei osittain pelkistyneitä väliaineita pääse vapautumaan (Stryer, 2000). Kupari-ioni osallistuu sytokromioksidaasissa sekä hapen sitomiseen että elektronien kuljetukseen. Kuparin puutostila aiheuttaa entsyymien aktiivisuuden ja soluhengityksen kapasiteetin alenemista nisäkkäillä erityisesti aivoissa, maksassa sekä sydämessä (Linder ja Hazegh-Azam, 1996).

4.2.3 Cu/Zn superoksididismutaasi

Superoksididismutaasi, SOD, (EC 1.15.1.1) on entsyymi, joka katalysoi kahden superoksidianionin (O_2^-) muuttumista hapeksi (O_2) ja vetyperoksidiksi (H_2O_2).

SOD esiintyy kaikilla aerobisilla organismeilla. Se on yleensä kuparia ja sinkkiä sisältävä entsyymi, mutta myös mangaani- ja rautamuotoja esiintyy etenkin bakteereilla. SOD on noin 32 kDa kokoinen homodimeeri, jonka jokaisessa alayksikössä on yksi kupari- ja yksi sinkki-ioni. Metallionit sijaitsevat kapean kanavan pohjalla olevassa aktiivisessa keskuksessa. Kupari ja sinkki ovat silloittuneina imidatsoliryhmän kautta. Kuparia koordinoi kolme histidiiniä ja sinkkiä kaksi histidiiniä sekä aspartaatti. Negatiivisesti varautunut superoksidianioni kulkeutuu positiivisesti varautuneeseen aktiiviiseen keskukseen ja sitoutuu kupari-ioniin (Linder ja Hazegh-Azam, 1996; Stryer, 2000).

Superoksididismutaasin katalyyttinen mekanismi on esitetty kuvassa 7. Superoksidianioni sitoutuu kovalenttisesti kupari-ioniin ja vetysitoutuu arginiinitähteen guanidoryhmään. Elektroni siirtyy superoksidilta kupari(II)ionille, jolloin muodostuvat kupari(I)ioni sekä happimolekyyli vapautuvat. Toinen superoksidianioni sitoutuu kupari(I)ioniin, arginiiniin sekä hydroksyyli-ioniin. Kupari(I)ioni luovuttaa elektronin superoksidianionille, joka saa vielä kaksi protonia hydroksyyli-ionilta sekä histidiiniltä. Vetyperoksidimolekyyli vapautuu ja entsyymi palaa kupari(II)-muotoon (Tainer *et al.*, 1983). SOD:n muodostamat vetyperoksidimolekyylit hävitetään ihmisen elimistössä ja muissa organismeissa muiden entsyymien, kuten katalaasin ja glutationiperoksidaasin, toimesta (Linder ja Hazegh-Azam, 1996; Stryer, 2000).



Kuva 7. Superoksididismutaasin ehdotettu mekanismi (Tainer *et al.*, 1983). Aktiivisen keskuksen kupari-ionin hapetusaste vaihtelee +1 ja +2 välillä. Histidiinitähde on koordinoitunut sinkki-ioniin ja osassa katalyysisykliä myös kupari-ioniin. Arginiinitähde osallistuu katalyysiin vetysidosten muodostajana.

Superoksididismutaasi on intrasellulaarinen entsyymi, jolla on elintärkeä rooli antioksidanttipuolustuksessa. SOD:n aktiivisuus on riippuvainen entsyymiin sitoutuneista kupari-ioneista. Metalloshaperoneihin kuuluvat kuparishaperonit ovat proteiineja jotka pitävät huolen että kupari-ioneja toimiakseen tarvitsevat biologiset systeemit saavat tarvitsemansa kuparin ilman että tätä metallia on vapaana soluissa (Bartnikas ja Gitlin, 2003). Vapaan kuparin määrän hiivasolussa on arvioitu olevan jopa vähemmän kuin 10^{-18} M, jolloin kussakin solussa on vapaita kupari-ioneja alle yksi (Rae *et al.*, 1999).

4.2.4 Metallotioneiniit

Metallotioneiniinit (tai kuparitioneiniinit) ovat pieniä polypeptidejä, jotka pystyvät sitomaan useita kahdenarvoisia siirtymämetalleja, etenkin Zn(II)-, Cd(II)- ja Cu(II)ioneja (mutta ei Fe(II)ioneja). Niiden uskotaan olevan tarkoitettu siirtymämetallien varastointiin sekä detoksifikaatioon, sillä vapaat siirtymämetallit saattaisivat häiritä muita aineenvaihdunnallisia reaktioita tai katalysoida ei-toivottuja kemiallisia reaktioita. Nisäkkäiden metallotioneiniinit ovat noin 6 kDa

suuria ja sisältävät 20 kysteiiniaminohappoa Cys-Cys tai Cys-X-Cys - sekvensseinä. Kysteiinit koordinoivat jopa seitsemän Zn(II) ja CD(II) (ja ehkä Hg(II)) -ionia tai 11–12 Cu(II)ionia. Ylimääräinen negatiivinen varaus on neutralisoitu useilla lysiinitähteillä tai muilla emäksisillä aminohappotähteillä. Affiniteetti suurimmasta pienimpään on $Hg > Cu > Cd > Ag > Zn$, mutta myös Ni, Co ja jopa Au voivat sitoutua. Kupari syrjäyttää muut alkuaineet, mikäli sen pitoisuus on suuri (Linder ja Hazegh-Azam, 1996).

Metallotieneiinien on epäilty osallistuvan myös kahteen muuhun toimintoon soluissa. Niiden on epäilty pystyvän luovuttamaan kupari- ja sinkki-ioneja entsyymeille, jotka vaativat näitä metalleja toimiakseen. Kuparia sisältävien metallotioneinien on myös epäilty osallistuvan hydroksyyli- ja superoksidianioniradikaalien detoksifikaatioon (Linder ja Hazegh-Azam, 1996).

4.3 Kupari-ionit ja radikaalien muodostus

4.3.1 Fenton ja Haber-Weiss -reaktiot

Pelkistyneet siirtymämetallit kuten kupari ja rauta edistävät reaktiivisten happimolekyylien muodostumista. Näiden metalli-ionien hapettuminen molekulaarisella hapella tuottaa yhtälön (1) mukaan superoksidiradikaalin. Superoksidiradikaalin dismutaatio muodostaa vetyperoksidia, joka on esitetty yhtälössä (2). Vetyperoksidin puolestaan tiedetään reagoivan pelkistyneiden metalli-ionien, erityisesti Fe^{2+} ja Cu^{1+} kanssa Fenton-reaktiolla muodostaen hydroksyyli- ja radikaaleja. Tämä on esitetty yhtälössä (3). Yhtälöissä M^{n+} voi olla joko Cu^{2+} tai Fe^{3+} .



Toisaalta superoksidiradikaalin dismutaation vetyperoksidin läsnäollessa tiedetään tuottavan reaktiivisempaa hydroksyyli-radikaalia Haber-Weiss -reaktiolla, joka on esitetty yhtälössä (4) (Green ja Hill, 1984).



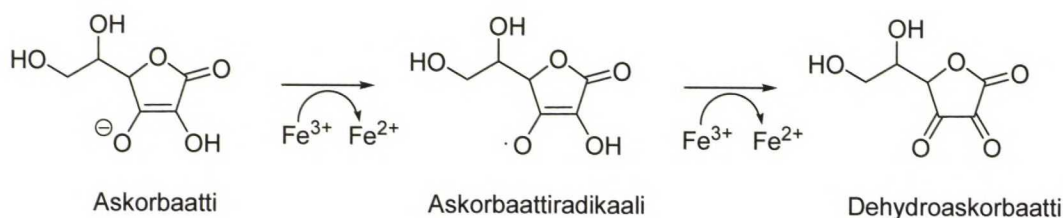
4.3.2 Askorbaatti

C-vitamiini eli askorbiinihappo (tässä: askorbaatti) on ihmiselle välttämätön vitamiini, jonka puute aiheuttaa keripukkia (Pelletier, 1985). Ihmisten kykenemättömyyttä syntetisoida askorbaattia on pidetty suurena perinnöllisenä puutteena ja sen on ajateltu lyhentävän ihmiskehon kestoaikaa ja ihmisten elinikää. Kuitenkin vähitellen on alettu olla sitä mieltä että askorbaatti osallistuu ennemmin vanhenemiseen kuin elimistön säilymiseen ja että askorbaatti voi olla jopa vahingollinen elimistölle (Cutler, 1984).

Askorbaatti on vahva pelkistin eli antioksidantti. Askorbaatin hapettuminen tuottaa dehydroaskorbaattia. Hapettuminen hapen läsnäollessa tapahtuu helposti emäksisessä liuoksessa tai etenkin rauta- tai kupari-ionien läsnäollessa ja tällöin muodostuu vetyperoksidia. (Pelletier, 1985; Chiou, 1983). Hapettumisen on ehdotettu tapahtuvan yhtälöiden (5) ja (6) mukaisesti.



Yhtälöissä M^{n+} voi olla joko Cu^{2+} tai Fe^{3+} . Kuvassa 8 on esitetty askorbaatin osallistuminen metalli-ionien pelkistämiseen yhtälön (5) mukaan. Yhden metalli-ionin pelkistyessä askorbaatti hapettuu stabiiliksi, mutta hyvin toksiseksi, askorbaattiradikaaliksi. Toisen metalli-ionin pelkistyminen tuottaa dehydroaskorbaatin.



Kuva 8. Askorbaatin metalleja pelkistävä rooli (Bugg, 2004). Yhden askorbaattimoleekyylin hapettuminen ensin askorbaattiradikaaliksi ja edelleen dehydroaskorbaatiksi pelkistää kaksi rauta- tai kupari-iona.

Yhtälön (6) mukaan askorbaatin hapettuminen kupari- tai rautaionin läsnäollessa tuottaa vetyperoksidia, joka puolestaan vuorovaikutuksessa näiden metalli-ionien kanssa tuottaa hyvin reaktiivisia hydroksyyli-radikaaleja yhtälöiden (1)-(4) mukaan (Chiou, 1983). Toisaalta on mahdollista että askorbaatti osallistuu metalli-ionien kierrättämiseen pelkistämällä hapettuneita metalli-ioneja (Bugg, 2004). Askorbaatin on epäilty myös kelatoivan kupari-ioneja (Linder ja Hazegh-Azam, 1996).

4.3.3 Kupari-ionien aiheuttama radikaalien muodostus ihmiskehossa

Altistus ylimäärälle kuparia vaurioittaa soluja ja elimiä. Teoriassa ja *in vitro* kupari-ionit ja -kompleksit voivat katalysoida reaktiivisen hapen syntyä. Reaktiivisen hapen muodot, kuten superoksidiradikaali, vetyperoksidi ja hydroksyyli-radikaali vaurioittavat biomolekyyliä, kuten rasvoja, proteiineja ja DNA:ta (Linder, 2001). Kysymys onkin, että tapahtuuko tällaista *in vivo*.

Kupari kuljetetaan organismeissa, siten ettei radikaaleja pääse muodostumaan. Verenkiertoon tulevat kupari-ionit sitoutuvat suoraan proteiineihin, kuten albumiini ja transkupreiini, joilla on hyvin korkea affiniteetti kuparia kohtaan. Nämä proteiinit luovuttavat kupari-ionit tietyille solumembraanien kuljetusproteiineille. Edelleen tietyt sytoplasman proteiinit, kuten kuparishaperonit, kuljettavat kupari-ioneja eteenpäin sytoplasman proteiineille, kuten superoksididismutaasille, sekä erityisille kuljetusproteiineille soluorganellien membraaneissa, kuten mitokondrioissa ja Golginlaitteissa. Nämä puolestaan kuljettavat kupari-ioneja näiden organellien proteiineille kuten

sytokromioksidaasille. Sekä verenkierrossa että soluissa kupari luovutetaan suoraan proteiinin proteiinille ja vapaan kuparin pitoisuus soluissa on käytännössä nolla (Linder, 2001).

Radikaalien syntymisen elimistössä on ehdotettu olevan yhteydessä tiettyihin sairauksiin, kuten sokeritautiin ja syöpään, sekä vanhenemiseen. Näiden radikaalien syntymisen syytä ei tiedetä, mutta on arveltu että syy voisi liittyä elimistön kohonneisiin siirtymämetallipitoisuuksiin. Plasman kupari- ja rautapitoisuuksien on havaittu kohoavan iän myötä sekä esimerkiksi sokeritaudin yhteydessä (Kocha *et al.*, 1997).

5 METALLI-IONIT PROTEIINIEN KATKAISUSSA

5.1 Biomolekyylien degradaatio

Chiou (1983) havaitsi kupari-ionin ja askorbaatin sekä rautaionin ja askorbaatin yhteisvaikutuksen vaurioittavan viraalista DNA:ta sekä proteiineja *in vitro*. DNA:n ja proteiinien pilkkoutuminen tapahtui minuuteissa huoneenlämmössä ja EDTA:n todettiin tehokkaasti pysäyttävän pilkkoutumisreaktion. Eri proteiinien pilkkoutumisherkkyydessä oli eroja. Chioun mukaan pilkkoutumisen syy oli hydroksyyli-radikaali, jota muodostuu vetyperoksidin muodostuessa kuparin ja askorbaatin reaktioissa.

Kim *et al.* (1985) raportoivat tutkimustuloksista, joissa Fe^{3+} yhdessä DTT:n kanssa aiheutti entsyymien aktiivisuuden menetyksen sekä osittaisen hajoamisen pienempiin fragmentteihin useilla eri entsyymeillä. Vastaava tulos saatiin Fe^{3+} -ioneilla ja askorbaatilla. Reaktio tapahtui muutamassa tunnissa 30 °C:ssa ja vaati happea toimiakseen. Glutamiinisyntetaasientsyymien täydellinen aktiivisuuden menetys oli havaittavissa tunnin inkuboinnin jälkeen. Adenyyliylitransferaasin noin 50 %:n hajoaminen oli havaittavissa 3 h inkuboinnin jälkeen. Myös Kim *et al.* epäilivät proteiinien hajoamisen olevan seurausta hydroksyyli-radikaaleista.

Myös Kocha *et al.* (1997) totesivat tutkimuksissaan vetyperoksidia sisältävään liuokseen lisätyn Cu^{2+} -ionien muodostavan hydroksyyli-radikaaleja ja aiheuttavan proteiinien hajoamista. Albumiinin kokonaisvaltainen hajoaminen SDS-PAGE-analyysissä saavutettiin 37 °C:ssa vuorokauden inkuboinnilla. Fe^{2+} ja Fe^{3+} -ionien puolestaan todettiin samoissa olosuhteissa tuottavan vain hyvin vähän hydroksyyli-radikaaleja, mutta lisättäessä liuokseen EDTA:ta radikaalin muodostus lisääntyi huomattavasti. EDTA esti hydroksyyli-radikaalien muodostumisen ja proteiinin hajoamisen Cu^{2+} -ioni katalysoidussa Fenton

reaktiossa, mutta lisäsi tätä ilmiötä Fe^{2+} katalysoidussa Fenton reaktiossa. Kocha *et al.* mukaan EDTA:n kiihdyttämä proteiinien hajoaminen Fe^{2+} katalysoidussa reaktiossa saattaa selittyä sillä että Fe^{2+} /EDTA -kompleksi on avoin rakenne, josta hydroksyyiliradikaaleja pääsee karkaamaan liuokseen.

Radikaalipuhdistajilla (engl. radical scavengers) tehdyissä kokeissa Kocha *et al.* totesivat että kupari(II)ionit sitoutuvat albumiiniin ja kupari-ionin sitoutumiskohdassa syntyneet hydroksyyiliradikaalit käynnistävät proteiinin spesifisen degradaation. Hydroksyyiliradikaalipuhdistaja, mannitoli, ei pystynyt estämään albumiinin degradaatiota Cu^{2+} -katalysoidussa reaktiossa todennäköisesti vahvasta hydroksyyiliradikaalien lokalisaatiosta johtuen. Fe^{2+} /EDTA -katalysoitu hapettuminen puolestaan aiheutuu liuoksessa vapaana olevien Fe^{2+} /EDTA -kompleksin ja vetyperoksidin välisessä reaktiossa muodostuneista hydroksyyiliradikaaleista, jotka käynnistävät albumiinin epäspesifisen degradaation. Mannitoli esti albumiinin degradaation Fe^{2+} /EDTA -katalysoidussa reaktiossa.

5.2 Proteiinien spesifinen katkaisu

5.2.1 Kupari(II)ioni

Marx ja Chevion (1985) kertoivat julkaisussaan albumiinin spesifisistä muutoksista. He olivat havainneet, että albumiini pilkkoutui kupari-ionin ja askorbaatin vaikutuksesta viideksi eri fragmentiksi. Pilkkoutuminen saavutettiin hapen läsnäollessa 37 °C:een lämpötilassa toistamalla askorbaatin lisäys ja 15 minuutin inkubointi useita kertoja peräkkäin. Marx ja Chevion epäilivät pilkkoutumisen olevan seurausta hydroksyyiliradikaalien muodostumisesta.

Allen ja Campbell (1996) havaitsivat Cu^{2+} -ionin pystyvän katkaisemaan peptidiketjun kohtuullisella spesifisyydellä Ser-His tai Thr-His -sekvenssien kohdalta. Reaktion todettiin olevan hidas ja tapahtuvan 62 °C:een lämpötilassa

emäksisessä pH:ssa. Maksimissaan 45 %:n katkeaminen saavutettiin noin vuorokauden inkuboinnin jälkeen. Myös muiden histidiiniä sisältävien peptidien katkeamista todettiin tapahtuvan, mutta huomattavasti pienemmillä reaktionopeuksilla. EDTA:n todettiin pysäyttävän reaktion täydellisesti. Reaktiossa havaittiin tapahtuvaan myös hitaampaa degradatiivista hajoamista. Allen ja Campbell totesivat spesifisen katkeamisen olevan hydrolyysireaktio sekä mahdollisesti stoikiometrinen ja ensimmäistä kertalukua peptidi:Cu(II) -kompleksin suhteen. Radikaalien osallistumista katkeamisreaktioon pidettiin epätodennäköisenä.

Humphreys *et al.* (1999) tutkivat Asp-Lys-Thr-His sekvenssin sopivuutta fuusioproteiinin spesifiseksi katkaisukohdaksi kupari(II)ioneilla. Jopa 86 %:n katkeaminen saavutettiin 62 °C:ssa 29 h inkuboinnin jälkeen emäksisessä pH:ssa. Katkeamisen etenemisen todettiin olevan epälineaarinen ja katkeamistuotteita havaittiin vasta noin 2 h lag-vaiheen jälkeen. Katkeaminen lisääntyi lämpötilan, pH:n, inkubointiajan kasvaessa sekä Cu^{2+} -ionien määrän lisääntyessä. EDTA:n todettiin täydellisesti pysäyttävän reaktion. Katkeamisen todettiin tapahtuvan Lys ja Thr -tähteiden välistä. Vaikka katkeamisreaktion mekanismia ei tunnettu, Humphreys *et al.* epäilivät katkeamisen johtuvan hydroksyyli-radikaalien muodostumisesta.

Myöhemmin Humphreys *et al.* (2000) raportoivat uusista tutkimustuloksista, joissa saavutettiin katkaisukohdan mutageneesillä parempi tehokkuus kupari(II)ionilla tapahtuvassa spesifisessä fuusioproteiinien katkaisu-reaktiossa. Glu-Lys-Ser-His sekvenssillä saavutettiin noin 92 %:n katkeaminen 30 h inkuboinnilla ja Asp-Lys-Ser-His sekvenssillä jopa noin 100 %:n katkeaminen 24 h inkuboinnilla. Myös Ni^{2+} -ionilla saavutettiin 20–30 %:n katkeaminen ja Co^{2+} -ionilla alle 10 %:n katkeaminen. Vetyperoksidilla ja askorbaatilla ei havaittu olevan vaikutusta katkaisutehokkuuteen.

5.2.2 Rautakelaatit

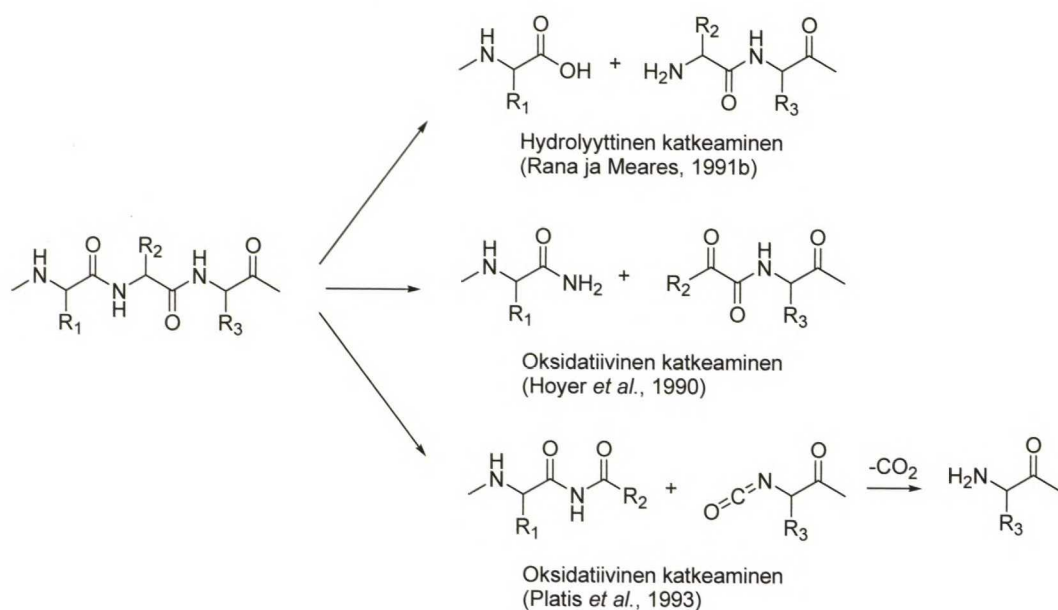
Useat metallikelaatit sitoutuvat kovalenttisesti tai affiniteetilla proteiineihin ja mahdollistavat proteiinin katkaisemisen läheltä kolmiulotteista kiinnittymiskohtaa reaktiivisten hapen muotojen kuten hydroksyyli-radikaalin avulla. EDTA kelatoi helposti rautaionin ja muodostunut kompleksi voidaan ohjata halutulla tavalla proteiinin tiettyyn kohtaan ja näin saada aikaan proteiinin kemiallisia muutoksia tai pilkkoutumista.

Hoyer *et al.* (1990) totesivat tutkimuksissaan biotiiniin kiinnitetyn EDTA:n mahdollistavan redox-aktiivisten Cu^{2+} tai Fe^{3+} -ionien kuljetuksen streptavidiinin sitoutumiskohtaan ja aikaansaavan streptavidiinin peptidiketjun selektiivisen katkeamisen läheltä biotiinin sitoutumiskohtaa. Katkeaminen tapahtui hapen läsnäollessa neutraalissa pH:ssa muutaman minuutin inkuboinnin aikana. Hoyer *et al.* mukaan kyseessä oli hapettava katkeamismekanismi. Streptavidiinin inkubointi Cu^{2+} -EDTA:n tai Fe^{3+} -EDTA:n läsnäollessa ei aiheuttanut katkeamista. Streptavidiinin inkubointi puolestaan vapaan Cu^{2+} -ionin kanssa tuotti kaksi katkeamistuotetta, joista kumpikaan ei ollut sama kuin biotiini-EDTA -reaktion katkeamistuotteet. Vapaa Fe^{3+} -ioni ei aiheuttanut katkeamista.

Rana ja Meares (1990) totesivat tutkimuksissaan kehittäneensä rautakelaatin 1-(p-bromoasetamidobentsyyli)-EDTA- Fe^{2+} (Fe-BABE), joka kiinnittyi proteiini kysteiinitähteisiin ja askorbaatin ja vetyperoksidin vaikutuksesta pilkkoi BSA proteiinin muutamaaan fragmenttiin parin sekunnin aikana. Myöhemmin Rana ja Meares (1991a) onnistuivat pilkkomaan samalla kelaatilla myös ihmisen karboanhydraasi I:n (engl. human carbonic anhydrase I) vastaavissa olosuhteissa. Reaktion epäiltiin olevan radikaalireaktio. Seuraavassa julkaisussaan Rana ja Meares (1991b) totesivat kuitenkin reaktion olevan peptidisidoksen hydrolyysi hapettumisen sijaan. Pilkkoutumisen todettiin olevan seurausta hyvin voimakkaan nukleofiilin selektiivisestä hyökkäyksestä peptidisidoksen karbonyylihiileen. Yhden askorbaatin ja yhden vetyperoksidimolekyylin oli todettu pilkkovan yhden peptidisidoksen (1:1:1 stoikiometria).

Schepartz ja Cuenoud (1990) raportoivat TFE-Fe molekyylistä, joka mahdollisti kalmoduliiniproteiinin (engl. calmodulin) hapettavan katkaisun. TFE-Fe koostui EDTA-Fe -kelaatista sekä siihen kovalenttisesti kiinnitetystä kalmoduliinin antagonistista trifluoroperatsiinista (TFP). Käyttämällä kalmoduliinin antagonistia voitiin redox-aktiivinen rauta ohjata proteiini aktiiviseen keskukseen ja aikaansaada proteiinin pilkkoutuminen. Katkeaminen tapahtui huonolla saannolla hapen ja DTT:n läsnäollessa 7 °C:een lämpötilassa neutraalissa pH:ssa muutamassa minuutissa. Katalaasin reaktiota inhiboiva vaikutus antoi viitteitä radikaalireaktiosta.

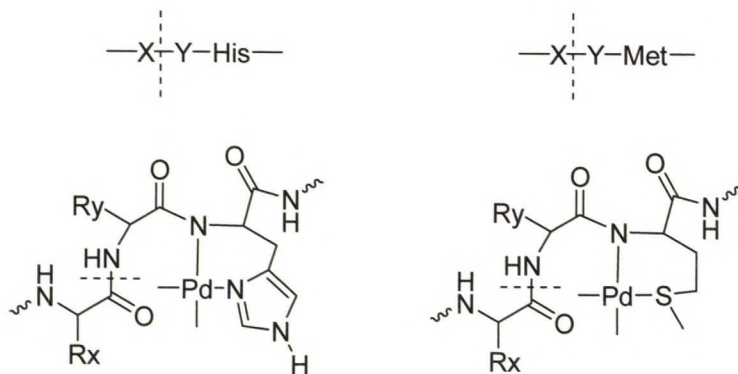
Pari vuotta myöhemmin saman tutkimusryhmän julkaisussa Ermácora *et al.* (1992) esittelivät kysteiinispesifisen (EDTA-2-aminoetyyli)-pyridyylidisulfidi -molekyylin (EPD), jolla EDTA-Fe³⁺ -kompleksi voitiin kemiallisesti liittää proteiinin kysteiinitähteeseen. Lisättäessä askorbaattia proteiini pilkkoutui muutamassa minuutissa 4 °C:ssa todennäköisesti reaktiivisten hapen muotojen vaikutuksesta läheltä EDTA-Fe -kiinnittymiskohtaa proteiinin tertiäärisessä rakenteessa. Reaktiomekanismin laajemmissa tutkimuksissa Platis *et al.* (1993) totesivat reaktion olevan oksidatiivinen, mutta havaitsivat myös sekä Hoyer *et al.* (1990) että Rana ja Meares (1991b) esittämien reaktiomekanismien mukaisia reaktiotuotteita. Nämä on esitetty kuvassa 9. Rana ja Meares mukaisessa hydrolyysissä katkeamiskohtaan muodostui proteiinin normaalit karboksyyli- ja aminopäät. Hoyer *et al.* mukaisessa oksidatiivisessa reaktiossa muodostuivat amidi sekä pyruvaatti ja Platis *et al.* mukaisessa oksidatiivisessa reaktiossa N-terminaaliseen katkeamistuotteeseen α -hiilen karbonyyliryhmä ja C-terminaaliseen tuotteeseen isosyanaatti, joka hajosi edelleen muodostaen vapaan aminoryhmän.



Kuva 9. Erilaisilla EDTA-Fe -kelaateilla tapahtuvien proteiinin katkeamisreaktioiden mahdolliset katkeamistuotteet hydrolyysillä tai kahdella erilaisella hapetusreaktiolla (Platis *et al.*, 1993). Hydrolyysissä katkeamiskohtaan muodostui proteiinin normaalit karboksyyli- ja aminopäät. Oksidatiivisessa reaktiossa muodostuivat amidi sekä pyruvaatti tai N-terminaalisen α -hiilen karbonyyliryhmä ja isosyanaatti, joka hajosi edelleen muodostaen vapaan aminoryhmän.

5.2.3 Palladium(II)ioni

Milović ja Kostić (2003) totesivat tutkimuksissaan onnistuneensa kehittämään spesifisen peptidiketjun katkaisumenetelmän palladium(II)ionilla. He raportoivat että $[\text{Pd}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$ ioni pystyy selektiivisesti hydrolysoimaan X-Pro -sidoksen X-Pro-Met ja X-Pro-His sekvenssien kohdalta, jossa X voi olla mikä tahansa aminohappo. Tutkijoiden mukaan histidiini- ja metioniinitähteet osallistuvat palladiumreagenssin tunnistukseen ja sitoutumiseen. Tämä on esitetty kuvassa 10.



Kuva 10. Palladium(II)reagenssin koordinoituminen histidiini- ja metioniinitähteisiin proteiineissa (Milović ja Kostić, 2003). Heikosti emäksisissä olosuhteissa Palladium(II)reagenssi katkaisee spesifisesti X-Y -peptidisidoksen X-Y-His ja X-Y-Met sekvenssien kohdalta.

Milović ja Kostić mukaan katkaisu voidaan muuttaa aminohappotähdespesifisestä sekvenssispesifiseksi säätämällä pH:ta. Heidän mukaansa happamassa pH:ssa mikä tahansa X-Y -sidoks X-Y-Met tai X-Y-His sekvensseistä katkeaa ja vastaavasti hieman happamassa tai neutraalissa pH:ssa vain X-Pro -sidoks X-Pro-Met tai X-Pro-His sekvensseistä katkeaa. Katkeaminen vaatii ekvimolaarisen määrän palladium(II)reagenssia ja proteiinia. Noin 50 %:n katkeaminen saavutettiin pH:ssa 2,0 20 °C:een lämpötilassa tunnin inkuboinnin jälkeen tai pH:ssa 7,0 40 °C:een lämpötilassa muutaman tunnin inkuboinnin jälkeen. Palladiumreagenssi oli mahdollista poistaa katkaisun jälkeen saostamalla dietyyliditiokarbamaatilla tai kompleksoimalla yleisillä kelatoivilla yhdisteillä kuten glutationi tai ditiolit.

5.3 Yhteenveto kupari- ja rautaionien osallistumisesta proteiinien pilkkoutumiseen

Vapaa kupari(II)ioni aiheuttaa biomolekyylien kuten proteiinien, rasvojen ja DNA:n degradaatiota. Proteiinien pilkkoutumisherkkydessä on huomattavia eroja ja tähän vaikuttaa merkittävästi proteiinin kyky sitoa kupari-ioneja. Kupari-iona luonnollisesti sitovien proteiinien kuten albumiinin on todettu olevan erityisen herkkiä kupari-ionien aiheuttamalle pilkkoutumiselle. Vapaa

kupari(II)ionin aiheuttama proteiinien pilkkoutuminen johtuu todennäköisesti hydroksyyiliradikaaleista ja radikaalien muodostuminen tapahtuu todennäköisesti Fentonkaltaisella kemialla. Radikaalipuhdistajilla ei ole luotettavasti pystytty osoittamaan hydroksyyiliradikaalien läsnäoloa kuparin aiheuttaman proteiinin pilkkoutumisen yhteydessä. Tähän saattaa vaikuttaa kuparin katalysoimien hydroksyyiliradikaalien vahva lokalisaatio hyvin lähellä kuparin kiinnittymiskohtaa. Vapailla kupari(II)ioneilla aikaansaadut spesifiset proteiinien pilkkoutumiset ovat hitaita ja vaativat reilun vuorokauden inkuboinnin. Reaktio tapahtuu korkeissa n. 60 °C:een lämpötiloissa. Hitaille kupari(II)ionipilkkoutumisille on esitetty reaktiomekanismina sekä hydrolyysiä että oksidatiivista katkeamista.

Vapaan rauta(III)ionin on todettu aiheuttavan vain vähäistä proteiinien degradaatiota. Tämä johtuu todennäköisesti proteiinien huonosta kyvystä sitoa rautaioneja. Lisättäessä reaktioliuokseen jotain rautaionia kelatoivaa yhdistettä kuten DTT tai EDTA, pystytään rautaioni ohjaamaan lähelle proteiinia, jolloin havaitaan merkittävää proteiinin pilkkoutumista. Proteiinien spesifistä pilkkoutumista on saatu aikaan syntetisoimalla erilaisia EDTA-Fe -kelaatin sisältäviä orgaanisia molekyylejä. Molekyyli voidaan kovalenttisesti kiinnittää proteiinin tiettyihin aminohappotähteisiin ja aktivoida askorbaatilla ja vetyperoksidilla, jolloin proteiinin pilkkoutuminen tapahtuu.

Askorbaatin hapettuminen metalli-ionien läsnäollessa tuottaa vetyperoksidia, josta muodostuu edelleen hyvin reaktiivisia hydroksyyiliradikaaleja. Toisaalta on mahdollista että askorbaatti osallistuu metalli-ionien kierrättämiseen pelkistämällä hapettuneita metalli-ioneja. Askorbaatin on epäilty myös kelatoivan kupari-ioneja ja edistävän siten proteiinien katkeamista. Kupari-ionien tai kuparikelaattien on yhdessä askorbaatin kanssa todettu aiheuttavan myös DNA:n spesifistä pilkkoutumista (Chiou, 1984; Chiou *et al.*, 1985). Myös DNA:n spesifiseen pilkkomiseen on kehitetty orgaanisia molekyylejä, jotka yhdessä EDTA-Fe -kelaatin kanssa pystyvät kiinnittymään DNA:han spesifisesti ja aikaansaamaan pilkkoutumista (Dervan, 1986).

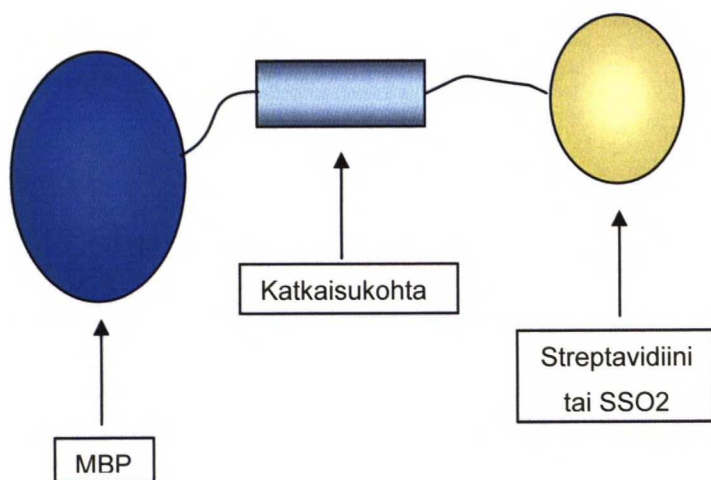
TUTKIMUSOSA

6 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

6.1 Materiaalit

6.1.1 Fuusioproteiinit

Tässä tutkimuksessa käytettiin fuusioproteiineja joiden N-terminaalisena fuusiopartnerina oli MBP ja C-terminaalisena fuusiopartnerina joko streptavidiini tai SSO2. Kaaviokuva käytetyistä fuusioproteiineista on esitetty kuvassa 11.



Kuva 11. Kaaviokuva tässä työssä käytetyistä fuusioproteiineista. Käytettyjen fuusioproteiinien N-terminaalisena fuusiopartnerina oli maltoosia sitova proteiini (MBP) ja C-terminaalisena fuusiopartnerina joko streptavidiini tai SSO2. Fuusiopartnereita yhdisti peptidilinkkeri, joka koostui histidiiniosasta sekä muuttumattomasta osasta molemmiin puolin histidiiniosaa. Histidiiniosa toimi fuusioproteiinien katkaisukohtana.

Kuvasta 11 nähdään, että käytetyissä fuusioproteiineissa fuusiopartnerit oli liitetty toisiinsa peptidilinkkerillä, joka koostui kahdesta osasta: histidiiniosasta sekä muuttumattomasta osasta molemmiin puolin histidiiniosaa. Histidiiniosa toimi fuusioproteiinien katkaisukohtana. Histidiiniosan pituus vaihteli proteiinista

riippuen 0:sta histidiinistä 10:neen histidiiniin. Taulukossa 4 on esitetty käytetyt fuusioproteiinit, niiden linkkerisekvenssit sekä monomeerien molekyylipainot. Käytettyjen fuusioproteiinien aminohapposekvenssit on esitetty kokonaisuudessaan liitessä 1.

Taulukko 4. Työssä käytetyt fuusioproteiinit, niiden linkkerisekvenssit sekä monomeerien molekyylipainot (Da=g/mol). MBP=maltoosia sitova proteiini, AVI=streptavidini.

Fuusioproteiini	Linkkerisekvenssi	Molekyylipaino (kDa)
MBP-H0-AVI	MBP-GSPTGASTGSPSGSPTGAST-AVI	59,1
MBP-H2-AVI	MBP-GSPTGASTHHGSPTGAST-AVI	59,1
MBP-H4-AVI	MBP-GSPTGASTHHHHGSPTGAST-AVI	59,3
MBP-H6-AVI	MBP-GSPTGASTHHHHHHGSPTGAST-AVI	59,6
MBP-H8-AVI	MBP-GSPTGASTHHHHHHHHGSPTGAST-AVI	59,9
MBP-H10-AVI	MBP-GSPTGASTHHHHHHHHHHGSPTGAST-AVI	60,2
MBP-H6-SSO2	MBP-GSPTGASTHHHHHHGSPTGAST-SSO2	74,0

MBP on *Escherichia coli* -bakteerin proteiini, jota käytetään paljon fuusioproteiineissa sen hyvien puhdistusominaisuuksien vuoksi. MBP:n puhdistaminen on mahdollista yhdessä puhdistusvaiheessa immobilisoidulla amyloosilla, josta se voidaan eluoida maltoosin avulla (Sambrook ja Russell, 2001). Streptavidini on biotiinia sitova *Streptomyces avidinii* -bakteerin proteiini, joka esiintyy yleensä n. 75 000 Da:n tetrameerinä (Bayer *et al.*, 1990). SSO2 puolestaan on *Saccharomyces cerevisiae* -hiivan proteiini, joka osallistuu normaalisti hiivasolussa solukalvon muutoksiin kuten kuljetusvesikkeliin fuusioihin solukalvoon sekä solun jakautumisen yhteydessä solujen kuroutumiseen irti toisistaan (Anon, 2004b).

6.1.2 Fuusioproteiinien tuotto ja puhdistus

Fuusioproteiinin tuotossa ja puhdistuksessa käytettiin soveltuvien osien kaupallista MBP:iin perustuvaa fuusioproteiinin ekspressio- ja puhdistussysteemiä (pMAL™ Protein Fusion and Purification System, New England Biolabs Inc., USA) Proteiinien tuotossa käytettiin valmiita *Escherichia coli* -bakteerin DH5alpha ja XL1-Blue -kantoja, joihin oli istutettu halutun proteiinin geenin sisältävä plasmidi.

E. coli -bakteerin puhtasviljelmät kasvatettiin 0,1 mg/ml ampisilliiniä sisältävillä LB-agarmaljoilla. LB-ravintoliuos (Luria-alusta) sisälsi 5,0 g/l hiivauutetta, 10 g/l tryptonia ja 10 g/l NaCl:a. Kasvatuksissa käytettiin LB-kasvatusalustaa, johon oli lisätty ampisilliiniä pitoisuutena 100 µg/ml sekä glukoosia pitoisuutena 112 mM. Proteiinin tuotto indusoitiin IPTG:llä pitoisuudella 0,3 mM.

Kasvatusliuoksen optista tiheyttä mitattiin spektrofotometrilla (Eppendorf Bio Photometer, Eppendorf, Saksa) aallonpituudella 600 nm. Kasvatusten solumassa erotettiin sentrifugoimalla 5000 rpm 15 min +4 °C (Sorval RC 5C Plus sekä Sorval RC 24, GSA roottori, Sorvall Instruments DuPont, USA). Solumassan suspendointiin käytettiin MAL-puskuria, jossa oli NaCl pitoisuutena 0,2 M, Tris-puskuria (pH 7,5) pitoisuutena 50 mM ja EDTA:a (pH 8,0) pitoisuutena 1 mM.

Solun sisäiset proteiinit kerättiin rikkomalla solut Soniprep 150 -sonikaattorilla (MSE Scientific Instruments, Englanti) 2,5 min:n ajan 17x7 mikronin amplitudilla 3 mm:n mittapäällä MSE Process Timer -ajastimella (MSE Ltd., Englanti). Kiintoaines erotettiin sentrifugoimalla 9000 g 20 min +4 °C (SS-34 roottori, Sorvall).

6.1.2.1 Affiniteettikromatografia

Affiniteettikromatografiapylväässä käytettiin kaupallista MBP-fuusioproteiinien puhdistukseen tarkoitettua affiniteettimatriisia (Amylose Resin, New England Biolabs Inc.). Käytetyn pylvään korkeus oli 6 cm ja halkaisija 1 cm. Pylvään tasapainotukseen ja pesuun käytettiin MAL-puskuria. Eluointiin käytettiin maltoosi-MAL-puskuria, joka sisälsi maltoosia pitoisuutena 1mM. Näytteen syötössä ja eluoinnissa käytettiin apuna pumppua (Peristaltic Pump P-1, Pharmacia LKB Biotechnology AB, Ruotsi) nopeudella 30–50 ml/h. Pesu- ja eluutiofraktioiden proteiinipitoisuus määritettiin spektrofotometrillä (Cary 100 Bio, UV-Visible Spectrofotometer, Varian, Australia).

6.1.2.2 Puskurin vaihto ja konsentrointi

Puskurin vaihtoon käytettiin kaupallisia geelisuodatuksen perustuvia puskurinvaihtopylväitä (Econo-Pac[®] 10DG, Bio-Rad Laboratories, USA). Uutena puskurina käytettiin 50 mM NH₄OAc:a pH 7,5. Puskurinvaihtofraktioiden proteiinipitoisuus määritettiin spektrofotometrillä (Cary 100 Bio). Puskuri vaihdettiin toistamiseen Vivaspin -konsentroitiputkilla (10000 MWCO PES, 6 ml, Vivascience Ltd., Saksa), jotka olivat kertakäyttöisiä ultrasuodatuksen perustuvia biologisten näytteiden konsentroiintiin ja/tai puhdistukseen suunniteltuja laitteita. Konsentroiinti suoritettiin sentrifugoimalla putkia 3000 rpm +4 °C (Centrifuge 5810R, Eppendorf). Konsentraatin proteiinipitoisuus määritettiin spektrofotometrillä (Cary 100 Bio).

6.1.3 SDS-PAGE

SDS-PAGE:ssa käytettiin 10–20 % Tris-HCl valmiita gradienttigeliejä (Ready Gel, Bio-Rad Laboratories) Ready Gel Cell Mini-PROTEAN[®] II -ajolaitteistolla (Bio-Rad Laboratories). Ajopuskurin koostumus on esitetty taulukossa 5 ja näytepuskurin koostumus taulukossa 6.

Taulukko 5. SDS-PAGE -ajopuskurin koostumus.

Komponentti	Pitoisuus
Tris	250 mM
Glysiini	1,92 M
SDS	0,001 %

Taulukko 6. SDS-PAGE -näytepuskurin koostumus.

Komponentti	Pitoisuus
Tris-HCl pH 6,8	25 mM
Glyseroli	5 %
SDS	1 %
Bromofenolin sininen	0,05 %
β-Merkaptoetanoli	2,5 %

Molekyylipainostandardina käytettiin LMW-molekyylipainostandardiseosta (Low Molecular Weight Calibration Kit for Electrophoresis, Amersham Biosciences,

Ruotsi), jonka koostumus on esitetty taulukossa 7. Näytteitä ajettiin 200 V jännitteellä ja 50 mA sähkövirralla EPS 3500 (Pharmacia, Ruotsi) -virtalähteellä, kunnes näyterintama saavutti geelin alalaidan. Geelit värjättiin Coomassie -väriliuoksella, joka sisälsi 8 % etikkahappoa ja 25 % etanolia sekä PhastGel® Blue R -väriä (Pharmacia Biotech) valmistajan ohjeen mukaan. Värin poistoon käytettiin värinpoistoliuosta joka sisälsi 8 % etikkahappoa ja 25 % etanolia. Geelit kuvattiin ja kuivattiin kahden Gel Drying Kit® -kalvon väliin (Promega, USA).

Taulukko 7. SDS-PAGE:ssa käytetyt proteiinistandardit sekä näiden moolekyyllipainot (Da=g/mol).

Proteiinistandardi	M (kDa)
Fosforylaasi b	97,0
Albumiini	66,0
Ovalbumiini	45,0
Karboninen anhydraasi	30,0
Trypsiini-inhibiittori	20,1
α -Lactalbumiini	14,4

6.1.4 Fuusioproteiinin peptidiketjun katkaisu vapaan kupari(II)ionin avulla

Tutkitussa fuusioproteiinin vapaalla kupari(II)ionilla tapahtuvassa katkaisureaktiossa käytetyt reaktioliuoskomponentit ja niiden tavalliset pitoisuudet on esitetty taulukossa 8. Reaktioissa käytetty vesi oli ionivaihdettua (Milli-Q, Millipore, Irlanti). Katkaisureaktioissa käytettiin tavallisesti 86 mM NaOAc pH 5,0 -puskuria, jonka NaCl-pitoisuus oli 171 mM. Reaktiossa käytettiin kuparisulfaattia ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, Riedel de Haën, Saksa) pitoisuutena 3,3 μM (=1ekv.). Askorbaattia (L-askorbiinihappo, Sigma) käytettiin tavallisesti pitoisuutena 4,6 mM ja vetyperoksidia (30 m-%, Riedel de Haën) pitoisuutena 0,35 mM. Reaktion pysäytykseen käytettiin 0,3 M EDTA:ta pH 7,5 loppupitoisuutena 30,8 mM (=10000 ekv.). Käytetyt askorbaatti- ja H_2O_2 -liuokset tehtiin joka kerta uudet ja askorbaatin pH säädettiin 1 M NaCO_3 :lla (Sigma-Aldrich, Saksa) lähelle neutraalia. Askorbaatin pH:n tarkistukseen käytettiin Acilit® -pH-liuskoja (Merck, Saksa).

Taulukko 8. Tyypillisen fuusioproteiinin vapaalla kupari(II)ionilla tehdyn katkaisureaktion reaktioliuoksen komponentit sekä niiden pitoisuudet.

Komponentti	Pitoisuus (M)
Puskuri	$86 \cdot 10^{-3}$
NaCl	$171 \cdot 10^{-3}$
Fuusioproteiini	$3,3 \cdot 10^{-6}$
CuSO ₄	$3,3 \cdot 10^{-6}$
Askorbaatti	$4,6 \cdot 10^{-3}$
H ₂ O ₂	$0,35 \cdot 10^{-3}$

Koesarjassa, jossa tutkittiin kuparipitoisuuden vaikutusta katkaisureaktioon, käytettiin kuparipitoisuuksia 1,6; 3,3; 6,6; 16,5; 32,9; 0,16; 0,33 ja 3,3 mM ($=\frac{1}{2}$, 1, 2, 5, 10, 50, 100 ja 1000 ekvivalenttia proteiiniin nähden). Koesarjassa, jossa tutkittiin askorbaatin vaikutusta katkaisureaktioon, käytettiin askorbaattipitoisuuksia 1,1; 2,3; 4,6; 9,1; 18; 37 ja 73 mM. Puolestaan koesarjassa, jossa tutkittiin vetyperoksidin vaikutusta katkaisureaktioon, käytettiin vetyperoksidipitoisuuksia 0,09; 0,17; 0,35; 0,69; 1,4; 2,8 ja 5,5 mM. Tutkittaessa käytetyn puskurin vaikutusta katkaisureaktioon, käytettiin puskureita NaOAc pH 5,0; NH₄OAc pH 7,0 ja Tris-HCl pH 7,5 pitoisuuksilla 8,6; 17 ja 86 mM sekä NaCl-pitoisuuksia 17, 86 ja 171 mM. Tutkittaessa pH:n vaikutusta käytettiin puskureita Glysiini-HCl pH 3,0; NaOAc pH 4,0 ja pH 5,0; Sitraatti pH 6,0; Hepes pH 7,0; Tris-HCl pH 8,0; Glysiini-NaOH pH 9,0 ja pH 10,0 pitoisuuksina 86 mM sekä ilman suolaa että 171 mM suolalla. Reaktiolämpötilan säätöön käytettiin ThermoHaake C25P (Thermo Electron Corporation, Saksa) ja Lauda Ecoline RE106 (Brinkmann Instruments Inc., Saksa) -vesihauteita.

6.1.4.1 Parhaat olosuhteet

Katkaisureaktiossa käytettiin fuusioproteiinia MBP-H8-AVI ja sitraatti -puskuria pH 6,0 pitoisuutena 86 mM ja NaCl:a pitoisuutena 171 mM. Katkaisussa käytettiin kupari(II)ionipitoisuutta 32,9 μ M ($=10$ ekv.), askorbaattipitoisuutta 4,6 mM ja vetyperoksidipitoisuutta 0,69 mM. Inkubointi suoritettiin joko huoneenlämmössä 60 min, +30 °C:ssa 20 min tai +30 °C:ssa 60 min.

6.1.4.2 Kupari(II)ioni, askorbaatti ja vetyperoksidi -tehosteet

Katkaisureaktio suoritettiin kuten tavallisesti, mutta 60 min inkuboinnin jälkeen tehostettaviin näytteisiin lisättiin toiset pitoisuudet kupari, askorbaatti+H₂O₂ tai kupari+askorbaatti+H₂O₂ -liuoksia, ja inkubointi toistettiin. Osaan tehostetuista näytteistä lisättiin vielä kolmannet pitoisuudet tehosteita ja inkubointi toistettiin kolmannen kerran. Askorbaatti- ja vetyperoksidiliuokset tehtiin uudet kumpaankin tehostukseen. Katkaisureaktio pysäytettiin lisäämällä EDTA. Näytteiden vertailukelpoisuuden vuoksi, reaktioliuosten käytettyjen komponenttien konsentraatiot oli skaalattu siten, että reaktion pysäytyksen jälkeen kunkin reaktioliuoksen tilavuus oli sama ja SDS-PAGE:lla identifioitava proteiinimäärä näytteissä oli myös sama.

6.1.5 Geelisuodatus

Fuusioproteiinin katkaisureaktiossa syntyneet proteiinifragmentit erotettiin toisistaan Superdex 200 HR 10/30 -geelisuodatuksella (Amersham Pharmacia Biotech). Kromatografian ohjaus ja seuranta suoritettiin joko Äkta Explorer (Amersham Pharmacia Biotech) tai FPLC (Pharmacia Fine Chemicals, Ruotsi) -kromatografialaitteistolla. Proteiinien eluotumista ulos pylväästä detektoitiin mittaamalla eluentin absorbanssia aallonpituudella 280 nm. Ajopuskurina käytettiin 0,45 µm HA-suodattimen (MFTTM -Membrane Filters, Millipore) läpi suodatettua 50 mM NaOAc pH 5,0; 0,2 M NaCl -puskuria tai 50 mM NH₄OAc pH 7,5; 0,2 M NaCl -puskuria. Käytetyt proteiinistandardit (Gel Filtration Calibration Kits, Amersham Pharmacia Biotech) on esitetty taulukossa 9.

Taulukko 9. Geelisuodatuksessa käytetyt proteiinistandardit sekä näiden molekyylipainot (Da=g/mol).

Geelisuodatusstandardi	M (kDa)
Ribonukleaasi A	15,7
Ovalbumiini	48,6
Albumiini	63,7
Katalaasi	209
Ferritiini	386

6.1.5.1 TCA-DOC-saostus

Geelisuodatusfraktioiden konsentroidiin käytettiin Vivaspin MWCO PES 10000 -konsentroitiputkia ja TCA-DOC-saostusta. Vivaspin-konsentraatin sisältämät proteiinit saostettiin liuoksesta joka sisälsi natriumdeoksykolaattia (DOC) (Sigma) pitoisuutena 100 µg/ml ja TCA:a (Merck) 10 %:n loppupitoisuutena. Proteiinisakka sentrifugoitiin erilleen 14000 rpm 45 min +4 °C (Eppendorf Centrifuge 5417R, Saksa). Sakka liuotettiin 35 µl:aan ionivaihdetta vettä ja näytteen pH säädettiin NH₃-höyryllä. Konsentroiduista proteiininäytteistä ajettiin SDS-PAGE kuten tarkistettaessa tuotettujen fuusioproteiinien puhtautta.

6.1.6 Ioninvaihto

Ioninvaihtopylväänä käytettiin Mono Q HR 5/5 -anioninvaihtopylvästä (Amersham Pharmacia Biotech). Kromatografian ohjaus ja seuranta suoritettiin FPLC -kromatografialaitteistolla. Proteiinien eluotumista ulos pylvästä detektoitiin mittaamalla eluentin absorbanssia aallonpituudella 280 nm. Ajopuskurina käytettiin 0,45 µm HA-suodattimen läpi suodatettua 20 mM Tris-HCl puskuria pH 7,5 tai pH 8,0 tai 20 mM bis-Tris puskuria pH 6,5. Proteiinit eluotitiin pylvästä gradientilla 0-100 %:iin vastaavalla puskurilla, jossa oli lisäksi 0,5 M NaCl.

6.1.6.1 Dot blot -vasta-ainevärijäys

Dot blot -vasta-ainevärijäyksessä käytettiin Trans-blot® -nitroselluloosakalvoja (Transfer Medium 0,2 µm, Bio Rad Laboratories). Blokkaukseen käytettiin 2 %:sta rasvatonta maitojauhetta (Valio Oy, Helsinki) TBST-puskurissa, joka sisälsi 10 mM Tris-HCl pH 8,0 -puskuria, 150 mM NaCl ja 0,05 % Tween® 20 (v/v) (Fluka). Primäärivasta-aineina käytettiin Anti-MBP Antiserum -vasta-ainetta (New England Biolabs Inc.) laimennoksena 1:10000, anti-Streptavidin -vasta-ainetta (Abcam Limited, UK) laimennoksena 1:75000 sekä VTT Biotekniikan omaa anti-SSO2 -vasta-ainetta laimennoksena 1:10000. Sekundäärivasta-aineena käytettiin Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) alkaalinenfosfataasikonjugaattia (Bio-Rad

Laboratories) laimennoksena 1:1000. Pesuihin ja laimennoksiin käytettiin TBST-puskuria. Värjäys tehtiin BCIP/NBT Color Development substrate -seoksella (BCIP=5-bromo-4-kloro-3-indolyylifosfaatti, NBT=nitro blue tetrazolium, Promega) AP-puskurissa, joka sisälsi 100 mM Tris-HCl pH 9,5, 100 mM NaCl ja 5 mM MgCl₂.

6.1.7 Massa-analyysi sekä N-terminaalinen sekvennointi

Massa-analyysit sekä N-terminaaliset sekvennoinnit tehtiin Helsingin Yliopiston Biotekniikan Instituutin Proteiinikemian laboratoriossa. Lähetetyt näytteet puhdistettiin käänteisfaasikromatografialla (RPC) C-1 geelimateriaalilla 0,1 % TFA:lla ja asetonitriligradientilla 0-100 % tai 0-60 % 60 minuutissa. Massa-analyysit tehtiin sekä MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time-of-Flight) (Biflex, Bruker Daltonics, USA) että ESI Q-TOF (Electrospray Ionization Quadrupol Time-of-Flight) (Micromass, Waters Corporation, USA) massaspektrometreilla. Näytteiden N-terminaalinen sekvenssi määritettiin Edman-degradaatiomenetelmällä Procise 494A -sekvenaattorilla (Applied Biosystems, USA).

6.2 Menetelmät

6.2.1 Fuusioproteiinin tuotto ja puhdistus

E. coli -bakteerin puhtasviljelmät kasvatettiin ampisilliini-LB -agarmaljoilla yön yli. Alkukasvatus tehtiin ampisilliini-glukoosi-LB -kasvatusalustalla ravistelupulloissa 100 ml:n kasvatustilavuudessa inkuboimalla kasvatuspulloja +37 °C:een lämpötilassa 200 rpm ravistelussa. Noin 18 tunnin kuluttua ympäri nuorennettiin siirrostamalla 5 ml ympäriä 500 ml:aan ampisilliini-glukoosi-LB - kasvatusalustaa.

Tuottokasvatuksen edistymistä seurattiin mittaamalla kasvatusliuoksen optista tiheyttä aallonpituudella 600 nm. Kasvatusliuoksen optisen tiheyden saavutettua

arvon 0,5, indusoitiin halutun proteiinin tuotto lisäämällä kasvatusliuokseen IPTG. Kasvatusta jatkettiin 3 tuntia, jonka jälkeen kasvatusliuoksen optinen tiheys mitattiin ja solumassa erotettiin sentrifugoimalla. 5000 rpm 15 min +4 °C. Solumassa suspendoitiin 31,5 ml:aan MAL-puskuria. Solun sisäiset proteiinit kerättiin rikkomalla solut sonikoimalla. Sonikointi suoritettiin jäähäuteella 15 s sonikointi- ja 30 s lepopulsseina. Kiintoaines erotettiin sentrifugoimalla 9000 g 20 min +4 °C.

6.2.1.1 Affiniteetikromatografia

Affiniteetikromatografia on proteiinien kromatografinen puhdistusmenetelmä, joka hyödyntää useiden proteiinien korkeaa affiniteettia tiettyjä kemiallisia yhdisteitä tai ryhmiä kohtaan. Menetelmässä halutut proteiinit tarttuvat reversiibelisti pylväsmateriaaliin kiinnitettyihin ligandeihin, epäpuhtaudet pestään pois ja haluttu proteiini eluoidaan pylvästä korkealla pitoisuudella vapaata ligandia (Stryer, 2000).

Sonikoinnin jälkeinen proteiinit sisältänyt supernatantti puhdistettiin affiniteetikromatografialla. Amyloosiresiinipylväs pakattiin ja tasapainotettiin valmistajan ohjeen mukaan MAL-puskurilla. Fuusioproteiinin MBP-fuusiopartneri sidottiin amyloosiaffiniteettimateriaaliin valuttamalla supernatantti affiniteettipylvään läpi. Tämän jälkeen pylvästä pestiin 15 ml:lla MAL-puskuria keräten 1 ml:n fraktioita. Proteiini eluointiin pylvästä 15 ml:lla maltoosi-MAL -puskuria. Eluoinnissa eluutiopuskurin maltoosi syrjäytti MBP:iin sitoutuneen amyloosin ja proteiini eluoutui ulos pylvästä. Eluoinnista kerättiin 1 ml:n fraktiot.

Proteiineissa olevat tyrosiini- ja tryptofaaniaminohapot absorboivat aallonpituudella 280 nm. Näytteen proteiinipitoisuutta voidaan detektoida mittaamalla näytteen absorbanssi tällä aallonpituudella. Mikäli näytteessä ei ole muita komponentteja, jotka absorboivat samalla aallonpituudella, voidaan absorbanssin voimakkuudesta arvioida näytteen proteiinipitoisuutta (Suominen,

2002). Pesu- ja eluutiofraktioista mitattiin spektri aallonpituusalueella 340-220 nm. Kolme eniten proteiinia sisältänyttä eluutiofraktiota yhdistettiin.

6.2.1.2 Puskurin vaihto ja konsentrointi

Yhdistettyjen eluutiofraktioiden EDTA:ta sisältänyt maltoosi-MAL-puskuri vaihdettiin kaupallisilla geelisuodatukseen perustuvilla Econo Pac[®] -puskurinvaihtopylväillä NH₄OAc:iin. Econo Pac[®] -puskurinvaihtopylväät tasapainotettiin uudella puskurilla valmistajan ohjeiden mukaan. Proteiininäyte lisättiin pylvääseen ja eluoiitiin uudella puskurilla keräten yhteensä 10 x 1 ml:n fraktioita. Fraktioista mitattiin spektri aallonpituusalueella 340-220 nm ja proteiinia sisältäneet fraktiot yhdistettiin.

Puskuri vaihdettiin toistamiseen Vivaspin -konsentrintiputkilla. Proteiininäyte pipetoitiin putkiin ja niitä sentrifugoitiin 3000 rpm +4 °C kunnes proteiiniliuoksen tilavuus oli noin 1 ml. Tilavuus täydennettiin uudella NH₄OAc-puskurilla 6 ml:aan ja sentrifugoitiin jälleen 1 ml:n tilavuuteen. Sama toistettiin toisen kerran. Konsentraatista mitattiin spektri aallonpituusalueella 340–220 nm ja proteiiniliuosta laimennettiin puskurilla kunnes saavutettiin absorbanssi 2,0. Proteiiniliuos jaettiin eppendorf-putkiin ja säilytettiin -20 °C:ssa.

Puhdistetun fuusioproteiinin pitoisuus liuoksessa (mg/ml) laskettiin kaavalla (7).

$$proteiininpitoisuus = \frac{A_{280}}{\epsilon \cdot l} \quad (7)$$

, jossa A_{280} = proteiiniliuoksen absorbanssi aallonpituudella 280 nm

ϵ = ekstinktiokerroin (ml/(cm·mg))

l = kyvetin valotien pituus (cm)

Proteiinikonsentraatio (mol/l) saatiin kaavalla (8).

$$c = \frac{\text{proteiininpitoisuus}}{M} \quad (8)$$

, jossa c = proteiinin konsentraatio (mol/l)

M = proteiinin molekyylipaino (g/mol = Da)

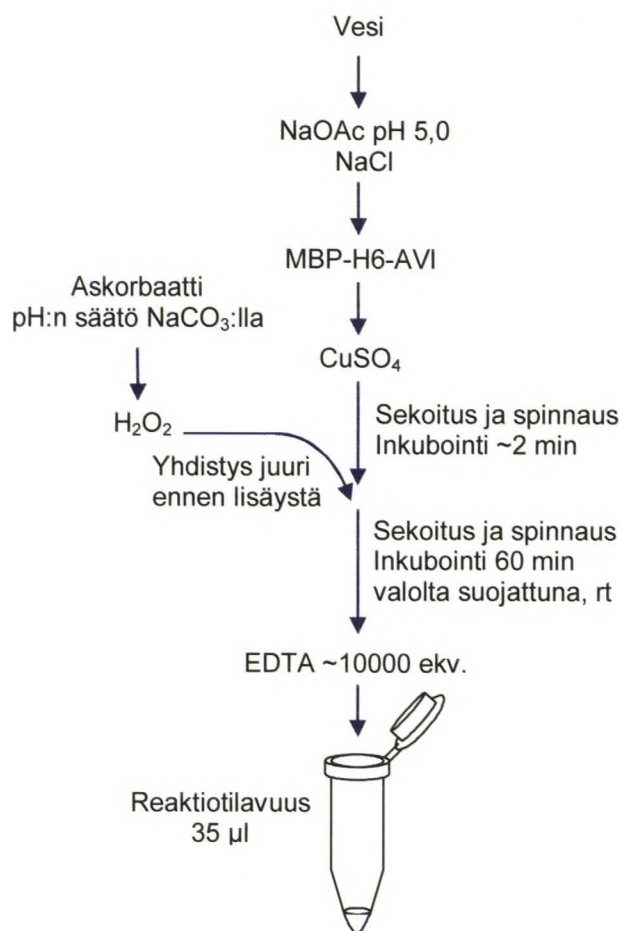
6.2.2 SDS-PAGE

SDS-polyakryyliamidigeelielektroforeesi on laajalti käytetty menetelmä, jolla voidaan luotettavasti arvioida polypeptidiketjujen molekyylipainoa. Menetelmässä tutkittavat proteiinit denaturoidaan keittämällä laimeassa detergenttiä, kuten natriumdodekyylisulfaattia (SDS), sisältävässä liuoksessa. Tällöin proteiinin kvaternäärinen, tertiäärinen ja sekundäärinen rakenne aukeaa. Usein keittoon lisätään myös β -merkptoetanolia, joka pelkistää proteiinin disulfidisillat. Denaturoitua proteiininäytettä ajetaan tämän jälkeen huokoisessa polyakryyliamidigeelimateriaalissa siihen johdettavan sähkövirran avulla. Denaturoitujen proteiinien liikkumiseen sähkövirrassa vaikuttaa vain molekyylikoko, jolloin suuret proteiinit liikkuvat hitaammin ja pienet nopeammin. Proteiinien koko saadaan selville värjäämällä geeli esimerkiksi Coomassie- tai hopeavärjäyksellä, jolloin proteiinijuovat tulevat näkyville. Vertaamalla proteiinijuovien sijaintia molekyylikooltaan tunnettujen standardien liikkumaan matkaan voidaan arvioida tutkittujen proteiinien molekyylipaino (Stryer, 2000).

Tuotettujen proteiinien puhtaus sekä koko määritettiin SDS-PAGE:lla. Proteiininäytteisiin lisättiin β -merkptoetanolia ja bromofenolin sinistä sisältävää näytekurikonsentraattia, siten että oikea näytekostumus saavutettiin. Näytteitä keitettiin 5 minuuttia 95 °C:ssa jonka jälkeen näytteet pipetoitiin geelin kaivoihin. Geelinä käytettiin valmiita kaupallisia geelejä. Näytteitä ajettiin sähkövirralla, kunnes näyterintama saavutti geelin alalaidan. Geelit värjättiin liuottamalla geeliä noin 20 min Coomassie -väriliuoksessa +50 °C:ssa. Värjäyksen jälkeen liika väri poistettiin liuottamalla geeliä värinpoistoliuoksessa, kunnes proteiinijuovat olivat selkeästi nähtävissä. Geelit kuvattiin ja kuivattiin.

6.2.3 Fuusioproteiinin peptidiketjun katkaisu vapaan kupari(II)ionin avulla

Tyypillinen esimerkki fuusioproteiinien peptidiketjun katkaisun suorituksesta vapaalla kupari(II)ionilla on esitetty kuvassa 12. Katkaisureaktio tehtiin eppendorf-putkissa lisäten aluksi vesi, puskuri, fuusioproteiini sekä kuparisulfaatti. Reaktioliuos sekoitettiin ja näytteitä inkuboitiin noin kaksi minuuttia. Laimennetut askorbaatti- ja H_2O_2 -liuokset yhdistettiin ja seos lisättiin välittömästi reaktioliuokseen. Reaktioliuoksia inkuboitiin huoneenlämmössä valolta suojattuna yleensä 60 min ajan. Tämän jälkeen katkaisureaktio pysäytettiin lisäämällä reaktioliuokseen ylimäärin EDTA:a, joka kelatoi reaktioliuoksessa olevat kupari-ionit. Käytetyt askorbaatti ja H_2O_2 -liuokset tehtiin joka kerta uudet ja askorbaatin pH säädettiin ennen käyttöä NaCO_3 :lla lähelle neutraalia.



Kuva 12. Kaaviokuva fuusioproteiinin peptidiketjun vapaalla kupari(II)ionilla tehdyn katkaisureaktion tyypillisestä suorituksesta. Aluksi näyteputkiin lisättiin vesi, puskuri, fuusioproteiini sekä kuparisulfaatti. Askorbaatti ja vetyperoksidi yhdistettiin ennen lisäystä. Sekoituksen jälkeen reaktioluosta inkuboitiin 60 min ja reaktio pysäytettiin lisäämällä ylimäärin EDTA:ta.

Fuusioproteiinin pilkkoutuminen visualisoitiin ajamalla näytteistä SDS-PAGE. SDS-PAGE:n näytteiden käsittely sekä ajo suoritettiin samoin kuten tarkistettaessa tuotetun fuusioproteiini puhtautta. Peptidilinkkerin, reaktio-olosuhteiden sekä reaktiokomponenttien pitoisuuksien vaikutuksien selville saamiseksi, katkaisureaktio toistettiin useaan kertaan vaihtelemalla käytettyä fuusioproteiinia, inkubointiaikaa, inkubointilämpötilaa, pH:ta, puskuria sekä suola-, kupari-, askorbaatti- ja vetyperoksidipitoisuutta.

6.2.3.1 Parhaat olosuhteet

Vapaalla kupari(II)ionilla tapahtuvan katkaisureaktion tulosta ja saantoa koetettiin parantaa valitsemalla kustakin testatusta muuttujasta parhaaksi havaittu peptidilinkkeri, reaktiokomponentin pitoisuus tai reaktio-olosuhde. Katkaisureaktio suoritettiin käyttämällä selvitettyjä parhaita olosuhteita ja katkeamistuotteet analysoitiin SDS-PAGE:lla.

6.2.3.2 Kupari(II)ioni, askorbaatti ja vetyperoksidi -tehosteet

Fuusioproteiinin vapaalla kupari(II)ionilla tapahtuvan katkaisureaktion saannon parantamiseksi, katkaisureaktio suoritettiin lisäämällä kupari, askorbaatti+H₂O₂ tai kupari+askorbaatti+H₂O₂ -tehosteita ja toistamalla inkubointi. Näin tuotiin reaktioliuokseen tuoreet reagenssit ja katkeamisen toivottiin etenevän. Tällä keinolla fuusioproteiinin katkeaminen pyrittiin saamaan täydellisemmäksi sekä testattiin mahdollinen katkeamisreaktiolle resistentin tai inaktiivin fuusioproteiinin esiintyminen. Katkaisureaktio suoritettiin kuten tavallisesti, mutta 60 min inkuboinnin jälkeen tehostettaviin näytteisiin lisättiin tehosteet ja inkubointi toistettiin. Osa tehostetuista näytteistä tehostettiin uudelleen ja 60 min inkubointi toistettiin kolmannen kerran. Katkaisureaktio pysäytettiin lisäämällä EDTA ja katkeamistuotteet analysoitiin SDS-PAGE:lla.

6.2.4 Geelisuodatus

Geelisuodatus on kromatografinen puhdistusmenetelmä, joka erottaa molekyylejä niiden koon ja muodon perusteella. Geelisuodatus perustuu tietyn huokoskoon omaavien geelien käyttöön. Suuret molekyylit, kuten proteiinit, kulkeutuvat suoraan geelimatriisin läpi ja tulevat ensin ulos erotuspylvästä. Pienet molekyylit kulkeutuvat huokosten sisälle ja näin ollen niiden kulkeutuminen matriisin läpi kestää huomattavasti pidempään (von Weymarn, 2002).

Fuusioproteiinin katkaisureaktiossa syntyneet proteiinifragmentit erotettiin toisistaan Superdex 200 -geelisuodatuksella. Proteiinien eluoitumista geelisuodatuspylvästä seurattiin mittaamalla eluentin absorbanssia aallonpituudella 280 nm sekä mittaamalla eluentin johtokykyä. Saadut proteiinipiikit tunnistettiin vertaamalla saatujen piikkien retentioaikoja tunnettujen proteiinistandardien retentioaikoihin sekä identifioimalla piikkien sisältämät proteiinit SDS-PAGE:lla. Geelisuodatus suoritettiin eluointinopeudella 0,25–0,5 ml/min ja eluoinnista kerättiin 0,3-1 ml:n fraktiot.

Vapaalla kupari(II)ionilla tapahtuvan katkaisureaktion ja sen reaktiotuotteiden geelisuodatuksella tapahtuvan erotuksen saanto laskettiin. Olettamalla että aallonpituudella 280 nm 1 AU = 1 mg/ml proteiinia, voitiin A_{280} -piikin sisältämä proteiinimäärä (mg) arvioida kaavalla (9). Tällöin piikin sisältämän proteiinin ainemäärä (mol) saatiin jakamalla proteiinimäärä proteiinin molekyylipainolla.

$$m_{MBP} = \frac{A_{MBP-piikki} \cdot V_{MBP-piikki}}{2} \quad (9)$$

Geelisuodatusnäytteenä käytetyn katkaisureaktioliuoksen fuusioproteiinipitoisuus laskettiin kaavalla (10) ja geelisuodatusnäytteen sisältämän MBP:n ainemäärä kaavalla (11) seuraavasti:

$$c_{fuusioproteiini}^{katkaisureaktioliuos} = \frac{c_{puhdasfuusioproteiini} \cdot V_{puhdasfuusioproteiini}}{V_{katkaisureaktioliuos}} \quad (10)$$

$$n_{MBP}^{geelisuodatusnäyte} = n_{fuusioproteiini}^{geelisuodatusnäyte} = C_{fuusioproteiini}^{katkaisureaktioliuos} \cdot V_{geelisuodatusnäyte} \quad (11)$$

MBP-saanto (%) saatiin vertaamalla geelisuodatuspiikin sisältämää MBP:n ainemäärää geelisuodatuksella analysoidun näytteen sisältämään MBP-ainemäärään kaavalla (12).

$$saanto = \frac{n_{MBP}^{piikki}}{n_{MBP}^{geelisuodatusnäyte}} \quad (12)$$

6.2.4.1 TCA-DOC-saostus

Geelisuodatuksessa saadut proteiinipiikit identifioitiin konsentroimalla piikkien sisältämät proteiinit ja analysoimalla SDS-PAGE:lla. Proteiinipiikin sisältäneet fraktiot yhdistettiin ja konsentroitiin aluksi Vivaspin -konsentroitiputkilla noin 1 ml:n tilavuuteen. Konsentraatin sisältämät proteiinit saostettiin TCA-DOC -saostuksella lisäämällä aluksi natriumdeoksykolaatti (DOC). Näytteitä inkuboitiin 30 minuuttia jäällä, jonka jälkeen lisättiin TCA-liuos. Inkubointia jatkettiin vielä tunti jäällä, jonka jälkeen sakka sentrifugoitiin erilleen nopeudella 14000 rpm 45 minuuttia +4 °C:een lämpötilassa. Sakka liuotettiin veteen ja näytteen pH säädettiin NH₃-höyryllä. Geelisuodatusfraktioiden sisältämien proteiinien molekyylipainot määritettiin ajamalla konsentroiduista näytteistä SDS-PAGE samoin kuten tarkistettaessa tuotetun fuusioproteiinin puhtautta.

6.2.5 Ioninvaihto

Ioninvaihto on proteiinien kromatografinen erotusmenetelmä, joka perustuu liuoksessa olevien varattujen molekyylien erilaiseen affiniteettiin varattua liukenematonta stationäärifaasia kohtaan. Proteiinit sitoutuvat ioninvaihtajan ionisoituviin ryhmiin silloin, kun ne kantavat ionivahtoryhmille vastakkaista varausta. Mitä enemmän sidoksia muodostuu, sitä suurempi on proteiinin affiniteetti ioninvaihtajaan. Proteiinit eluoidaan ioninvaihtopylvästä usein

nousevalla suolagradientilla tai pH:ta muuttamalla. Puskurin suolakonsentraation noustessa suolaionit alkavat kilpailla ioninvaihtomateriaaliin sitoutuneiden proteiinien kanssa ioninvaihtajan sitovista ryhmistä ja tietyssä vaiheessa suolaionit syrjäyttävät proteiinin, joka eluoituu ioninvahtajasta (Roe, 1989).

Fuusioproteiinien katkaisureaktiossa syntyneet proteiinifragmentit erotettiin toisistaan ioninvaihdolla. Ioninvaihtopylväänä käytettiin Mono Q -anioninvaihtopylvästä. Proteiinien eluoitumista ulos pylvästä detektoitiin mittaamalla eluentin absorbanssia aallonpituudella 280 nm. Ajopuskurina käytettiin suodatettua Tris-HCl puskuria pH 7,5 tai pH 8,0 tai bis-Tris puskuria pH 6,5. Proteiinit eluoitiin ulos pylvästä ajamalla nouseva suolagradientti 0-100 %:iin vastaavalla puskurilla, jossa oli 0,5 M NaCl. Ajot tehtiin eluointinopeudella 1,0 ml/min ja eluoinnista kerättiin 0,5 ml:n fraktiot.

6.2.5.1 Dot blot -vasta-ainevärjäys

Ioninvaihdossa saadut piikit identifioitiin tekemällä fraktioista dot blot -vasta-ainevärjäys. Kustakin tutkittavasta fraktioista pipetoitiin 2 µl nitroselluloosakalvolle, membraanien annettiin kuivua huoneenlämmössä ja blokkaukset suoritettiin +37 °C:ssa puolen tunnin ajan. Primäärinen vasta-aine sidottiin proteiineihin inkuboimalla membraaneja tutkittavasta proteiinista riippuen Anti-MBP, anti-Streptavidin tai anti-SSO2 -vasta-aineliuoksissa huoneenlämmössä tasoravistelussa noin 40 minuutin ajan. Sekundäärinen vasta-aine sidottiin primääriseen vasta-aineeseen inkuboimalla membraaneja Goat Anti-Rabbit AP -sekundäärivasta-aineliuoksessa huoneenlämmössä, tasoravistelussa noin 40 minuutin ajan. Värjäys tehtiin BCIP/NBT -liuoksella huoneenlämmössä tasoravistelussa kunnes vasta-aineen tunnistamat proteiinivyöhykkeet tulivat näkyviin. Värjäytyminen pysäytettiin inkuboimalla membraaneja vedessä muutamia minuutteja. Membraanien annettiin kuivua huoneenlämmössä. Blokkauksen ja vasta-aineiden sitomisien välissä membraaneja pestiin puskurilla.

6.2.6 Massa-analyysi sekä N-terminaalinen sekvennointi

Fuusioproteiinin katkaisutuotteena geelisuodatuksella eristetyt MBP-proteiinin, MBP-H6-SSO2 -fuusioproteiinin katkeamistuotteiden sekä puhtaan MBP-H6-SSO2 -fuusioproteiinin massat sekä N-terminaaliset sekvenssit määritettiin Helsingin Yliopiston Biotekniikan Instituutin Proteiinikemian laboratoriossa.

7 TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU

7.1 Fuusioproteiinin tuotto ja puhdistus

Puhdistettujen fuusioproteiinien pitoisuudet liuoksessa (mg/ml) laskettiin kaavalla (7) ja proteiinikonsentraatiot (mol/l) kaavalla (8). Esimerkkinä MBP-H8-AVI -fuusioproteiinin proteiinipitoisuuden laskeminen.

$$\text{proteiinipitoisuus} = \frac{2,0487}{1,763 \text{ ml} / (\text{cm} \cdot \text{mg}) \cdot 1 \text{ cm}} = 1,1621 \text{ mg} / \text{ml}$$

$$c = \frac{1,1621 \text{ mg} / \text{ml}}{60414 \text{ g} / \text{mol}} = 19,2348 \mu\text{mol} / \text{l} \approx 19,2 \mu\text{M}$$

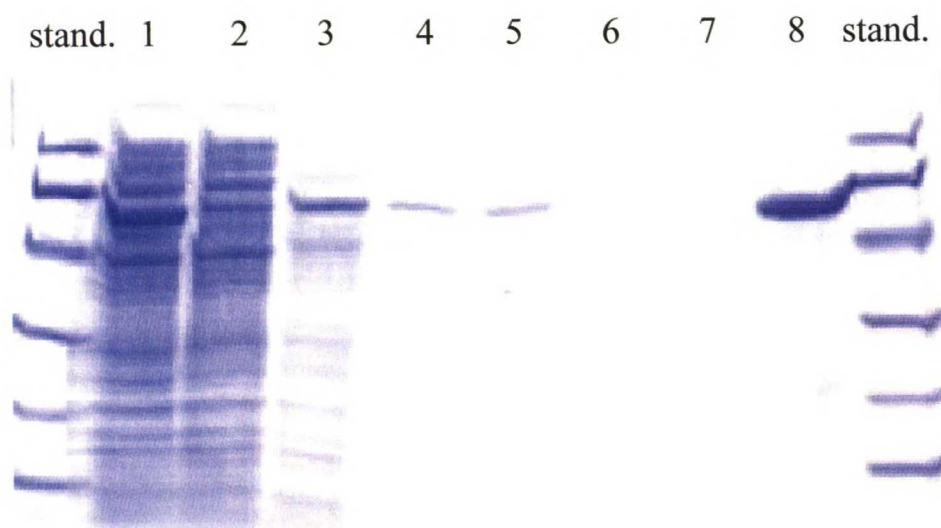
Taulukossa 10 on esitetty kaikkien tuotettujen fuusioproteiinien ekstinktiokertoimet, konsentroitujen fuusioproteiiniliuosten absorbanssit aallonpituudella 280 nm sekä lasketut proteiinikonsentraatiot. Taulukosta nähdään että saavutetut MBP-Hx-AVI -fuusioproteiinien konsentraatiot olivat kaikki lähellä 19,0 μM , kun taas MBP-H6-SSO2 -fuusioproteiinin konsentraatio oli erisuuruudesta ekstinktiokertoimesta johtuen 26,3 μM .

Taulukko 10. Tuotettujen fuusioproteiinien ekstinktiokertoimet, absorbanssit aallonpituudella 280 nm sekä proteiinikonsentraatiot.

Fuusioproteiini	ϵ (ml/(cm·mg))	A_{280}	c (μM)
MBP-H0-AVI	1,763	2,0461	19,2
MBP-H2-AVI	1,763	2,0161	18,9
MBP-H4-AVI	1,763	2,0498	19,2
MBP-H6-AVI	1,763	2,0452	19,2
MBP-H8-AVI	1,763	2,0487	19,2
MBP-H10-AVI	1,763	1,9976	18,8
MBP-H6-SSO2	0,996	2,0065	26,3

Tuotettujen fuusioproteiinien puhtaus tarkistettiin SDS-PAGE:lla. Kuvassa 13 on esitetty esimerkkinä MBP-H8-AVI -fuusioproteiinin puhdistuksen vaiheista sekä lopputuotteesta otetuista näytteistä ajettu SDS-PAGE. Kuvasta nähtiin että

sonikoinnin jälkeinen supernatantti sisälsi huomattavia määriä kaiken kokoisia proteiineja. Affiniteettimatriisin läpi tulleen supernatantin fuusioproteiinin määrä oli pienentynyt ja pylvään pesulla epäpuhtaudet saatiin poistettua. Viimeisestä näytteestä nähtiin, että lopullinen MBP-H8-AVI -fuusioproteiini oli puhdasta. Nähtävissä oli muutama hyvin pieni epäpuhtausjuova.



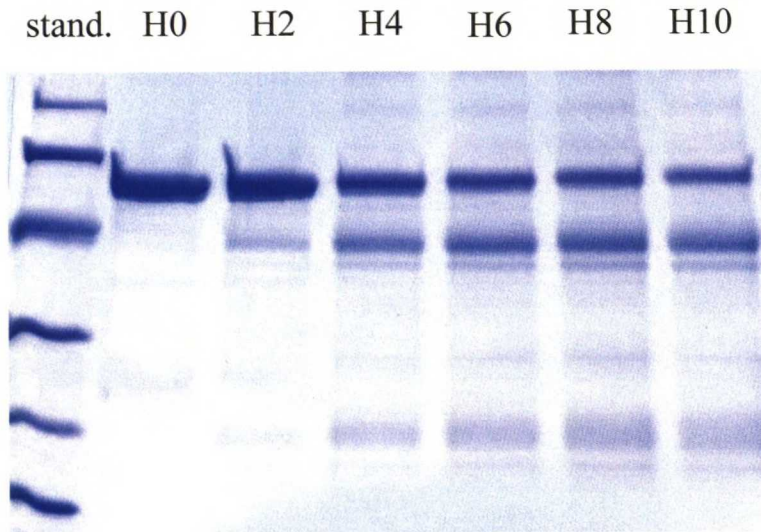
Kuva 13. Proteiinin puhdistuminen affiniteettipuhdistuksen erivaiheissa. 1: näyte sonikoinnin jälkeisestä supernatantista., 2: näyte affiniteettipylvään läpi tulleesta supernatantista, 3-7: näytteet affiniteettipylvään pesufraktioista, 8: näyte affiniteettipylvästä eluoidusta puhtaasta proteiinista. Proteiinistandardien molekyylipainot olivat 97, 66, 45, 30, 20 ja 14 kDa.

7.2 Katkaisureaktioon ja sen spesifisyyteen vaikuttavat tekijät

7.2.1 Peptidilinkkerin koostumus

Peptidilinkkerin vaikutusta fuusioproteiinin katkeamiseen tutkittiin tekemällä katkaisureaktio MBP-Hx-AVI -fuusioproteiinilla, jonka linkkerin histidiiniosa oli joko 0, 2, 4, 6, 8 tai 10. Näytteistä ajettu SDS-PAGE on esitetty kuvassa 14. Geelistä nähtiin että fuusioproteiinin peptidilinkkerin histidiiniosan pituus vaikutti merkittävästi katkeamistulokseen. Fuusioproteiinilla MBP-H0-AVI katkeamista ei

tapahtunut lainkaan, kun taas jo kahden histidiinin pituisella histidiiniosalla katkeamistuotteiden muodostumista oli nähtävissä. Histidiiniosan ollessa 8 tai 10, esiin tullut streptavidiinijuova oli leveä, indikoiden heterogeenistä streptavidiini -proteiinifragmenttia. Paras katkeamistulos saavutettiin MBP-H6-AVI tai MBP-H8-AVI -fuusioproteiinilla.



Kuva 14. Peptidiketjun aminohappokoostumuksen vaikutus MBP-Hx-AVI -fuusioproteiinin vapaalla kupari(II)ionilla tehtyyn katkaisureaktioon. Näytteitä inkuboitii 60 minuuttia huoneenlämmössä valolta suojattuna. Reaktioliuosten askorbaatti- ja vetyperoksidi-pitoisuudet olivat 4,6 mM ja 0,35 mM. Kunkin näytteen fuusioproteiinin peptidilinkkerin histidiiniosan pituus on merkitty kuvan yläpuolelle. Proteiinistandardien molekyylipainot olivat 97, 66, 45, 30, 20 ja 14 kDa.

7.2.2 Reaktio-olosuhteet

Kunkin reaktio-olosuhteen (puskuri, suolapitoisuus, pH, reaktiolämpötila ja reaktioaika) vaikutusta katkeamisreaktioon tarkasteltiin erikseen.

7.2.2.1 Puskuri

Puskurin vaikutusta katkaisureaktioon tutkittiin muutamalla eri puskurilla sekä eri puskurivahvuudella. Tutkitut puskurit sekä niiden testatut ionivahvuudet ja

arvioitua katkeamistulokset on esitetty taulukossa 11. Pienillä NaOAc ja NH₄OAc-pitoisuuksilla saatu katkaisutulos oli heikko ja runsaasti epäspesifistä katkeamista oli havaittavissa. Parhaat katkeamistulokset saatiin korkeimmalla testatulla, 86 mM:lla, ionivahvuudella.

Taulukko 11. Puskurin vaikutus MBP-H6-AVI -fuusioproteiinin vapaalla kupari(II)ionilla tehtyyn katkaisureaktioon. Näytteitä inkuboitii 60 minuuttia huoneenlämmössä valolta suojattuna. Reaktioliuosten askorbaatti- ja vetyperoksidipitoisuudet olivat 4,6 mM ja 0,35 mM. (+) Runsaasti fuusioproteiinia jäljellä ja/tai avidiini juova erottuu huonosti ja/tai runsaasti epäspesifistä katkeamista, (++) MBP- ja streptavidinijuovat erottuvat. Fuusioproteiinin määrä on pienentynyt, (+++) Streptavidinijuova erottuu hyvin eikä epäspesifistä katkeamista ole juurikaan tapahtunut, (-) Ei testattu tässä yhteydessä.

Puskuri	8,6 mM	17 mM	86 mM
NaAc pH 5,0	++	++	++
NH ₄ Ac pH 7,0	++	+	+++
Tris-HCl pH 7,5	-	++	+++

7.2.2.2 Puskurin suolapitoisuus

Puskurin suolapitoisuuden vaikutusta fuusioproteiinin vapaalla kupari(II)ionilla tapahtuvaan katkaisureaktioon tutkittiin. Testatut suolapitoisuudet sekä arvioitu katkeamistulos on esitetty taulukossa 12. Puskurin ionivahvuutena käytettiin parhaimmaksi todettua 86 mM ionivahvuutta. Katkeamistuloksen havaittiin paranevan nousevan suolapitoisuuden myötä molemmilla testatuilla puskureilla. Parhaimmaksi suolapitoisuudeksi osoittautui suurin testattu suolapitoisuus 171 mM.

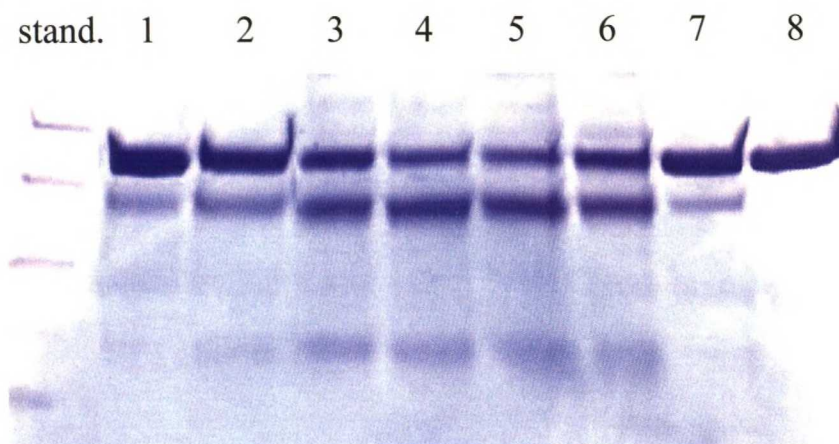
Taulukko 12. Puskurin suolapitoisuuden vaikutus MBP-H6-AVI -fuusioproteiinin vapaalla kupari(II)ionilla tehtyyn katkaisureaktioon. Näytteitä inkuboitii 60 minuuttia huoneenlämmössä valolta suojattuna. Reaktioliuosten askorbaatti- ja vetyperoksidipitoisuudet olivat 4,6 mM ja 0,35 mM. (+) Runsaasti fuusioproteiinia jäljellä ja/tai avidiini juova erottuu huonosti ja/tai runsaasti epäspesifistä katkeamista, (++) MBP- ja streptavidinijuovat erottuvat. Fuusioproteiinin määrä on pienentynyt, (+++) Streptavidinijuova erottuu hyvin eikä epäspesifistä katkeamista ole juurikaan tapahtunut.

Puskuri	-	17 mM NaCl	86 mM NaCl	171 mM NaCl
86 mM NaAc pH 5,0	+	++	+++	+++
86 mM Tris-HCl pH 7,5	++	++	+++	+++

7.2.2.3 pH

Reaktioliuoksen pH:n vaikutusta vapaalla kupari(II)ionilla tehtävään fuusioproteiinin katkaisureaktioon tutkittiin tekemällä katkaisureaktio MBP-H6-AVI -fuusioproteiinilla eri pH:issa. Näytteistä ajettu SDS-PAGE on esitetty kuvassa 15. Kuvassa esitetyt katkaisureaktiot on tehty 171 mM suolapitoisuudessa. Eri pH:iden vaikutusta katkaisureaktioon tutkittiin myös ilman suolan läsnäoloa. Tällöin havaittiin suuria eroja eri näytteiden välillä. Nämä erot aiheutuivat todennäköisesti käytetyistä puskureista. Kuvassa 15 esitetyssä suolan läsnäollessa tehdyssä koesarjassa tällaisia eroja ei havaittu. Erot eri näytteiden ja eri puskureiden välillä ovat loogiset ja noudattavat aluksi paranevaa ja lopuksi huononevaa trendiä katkaisutuloksessa pH:n noustessa. Onkin todennäköistä että kuvassa 15 esitetyssä koesarjassa näytteiden väliset erot johtuvat juuri eri pH:ista eivätkä eri puskureista.

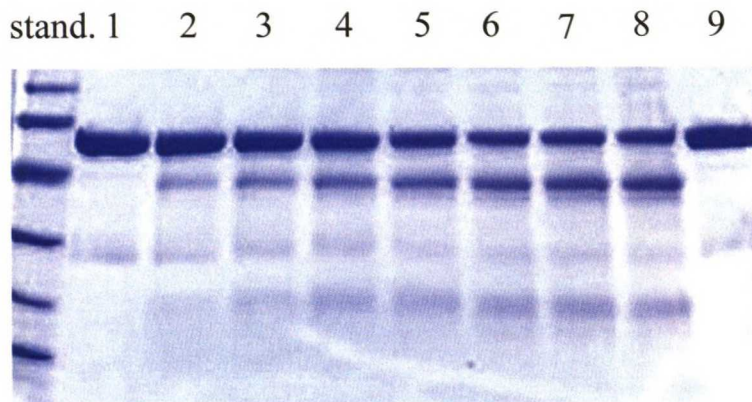
Kuvan 15 geelistä nähtiin että hyvin happamissa ja hyvin emäksisissä pH:issa katkaisureaktio toimii huonosti. pH:ssa 3, 4, 9 ja 10 katkeamistuotteita oli havaittavissa vain hyvin vähän tai ei lainkaan. pH-alueella 5-8 katkaisureaktio toimi hyvin. Paras katkeamistulos saavutettiin pH:ssa 6.



Kuva 15. pH:n vaikutus MBP-H6-AVI -fuusioproteiini vapaalla kupari(II)ionilla tehtyyn katkaisureaktioon. Näytteitä inkuboitii huoneenlämmössä 60 minuuttia valolta suojattuna. Reaktioliuosten askorbaatti- ja vetyperoksidipitoisuudet olivat 4,6 mM ja 0,35 mM. Reaktioliuosten suolapitoisuus oli 171 mM. Reaktioliuosten pH:t: näyte 1: pH 3, näyte 2: pH 4, näyte 3: pH 5, näyte 4: pH 5, näyte 5: pH 6, näyte 6: pH 7, näyte 7: pH 8, näyte 8: pH 9 ja näyte 9: pH 10. Proteiinistandardien molekyylipainot olivat 97, 66, 45, 30, 20 ja 14 kDa.

7.2.2.4 Reaktioaika

Reaktioajan vaikutusta vapaalla kupari(II)ionilla tehtävään fuusioproteiinin katkaisureaktioon tutkittiin tekemällä katkaisureaktio MBP-H6-AVI -fuusioproteiinilla ja inkuboimalla näytteitä eripituisen ajan. Näytteistä ajettu SDS-PAGE on esitetty kuvassa 16. Geelistä nähtiin että inkubointiajan noustessa katkaisutuotteiden määrä kasvoi. Tutkittu katkaisureaktio osoittautui hyvin nopeaksi, sillä jo kolmen minuutin inkuboinnin jälkeen katkaisutuotteita oli havaittavissa. Paras katkaisutulos saavutettiin inkubointiajalla 60 minuuttia. Nostettaessa inkubointiaikaa 60 minuutista 80 minuuttiin ei katkaisutuloksessa havaittu muutosta.

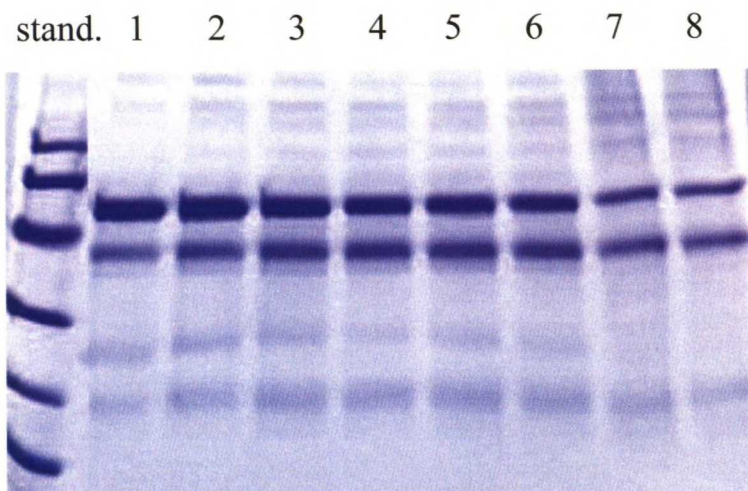


Kuva 16. Reaktioajan vaikutus MBP-H6-AVI -fuusioproteiinin vapaalla kupari(II)ionilla tehtyyn katkaisureaktioon. Näytteitä inkuboitiin huoneenlämmössä valolta suojattuna. Reaktioliuosten askorbaatti- ja vetyperoksidipitoisuudet olivat 4,6 mM ja 0,35 mM. Näytteessä 1 ei katkaisua. Näytteiden inkubointiajat: näyte 2: 3 min, näyte 3: 5 min, näyte 4: 10 min, näyte 5: 20 min, näyte 6: 40 min, näyte 7: 60 min, näyte 8: 80 min ja näyte 9: EDTA lisätty ennen kuparia. Proteiinistandardien molekyylipainot olivat 97, 66, 45, 30, 20 ja 14 kDa.

Kuvassa 16 esitettyssä geelissä kohdassa 9 on näyte joka on käsitelty kuten muutkin näytteet, mutta näytteeseen on lisätty EDTA jo ennen kuparisulfaattia. Tällöin lisätty EDTA kelatoi kupari-ionit heti niiden jouduttua liuokseen, eivätkä nämä pääse vuorovaikuttamaan fuusioproteiinien kanssa. Geelistä nähdään että näytteessä 9 katkeamista ei ole tapahtunut. Tämä varmistaa sen, että fuusioproteiinin katkeaminen tapahtuu oletetusti kupari(II)ionin vaikutuksesta inkuboinnin aikana eikä esimerkiksi SDS-PAGE -näytteiden keiton aikana.

7.2.2.5 Reaktiolämpötila

Reaktiolämpötilan vaikutusta vapaalla kupari(II)ionilla tehtävään fuusioproteiinin katkaisureaktioon tutkittiin tekemällä katkaisureaktio MBP-H6-AVI -fuusioproteiinilla ja suorittamalla näytteen inkubointi eri lämpötiloissa. Näytteistä ajettu SDS-PAGE on esitetty kuvassa 17. Geelistä nähtiin että katkaisutulos parani nousevan lämpötilan myötä, mutta mentäessä yli 50 °C:een katkaisutulos heikkeni. Myös lämpötilassa 0 °C katkeamistuotteita oli selvästi havaittavissa, joskin jäljellä olevan fuusioproteiinin määrä oli suuri. Lämpötiloissa 60 ja 70 °C havaittiin geelin ylälaidassa todennäköisesti proteiinien polymeroitumisesta aiheutuneita molekyylikooltaan suuria proteiinijuovia. Paras katkeamistulos saavutettiin lämpötilassa 30 °C.



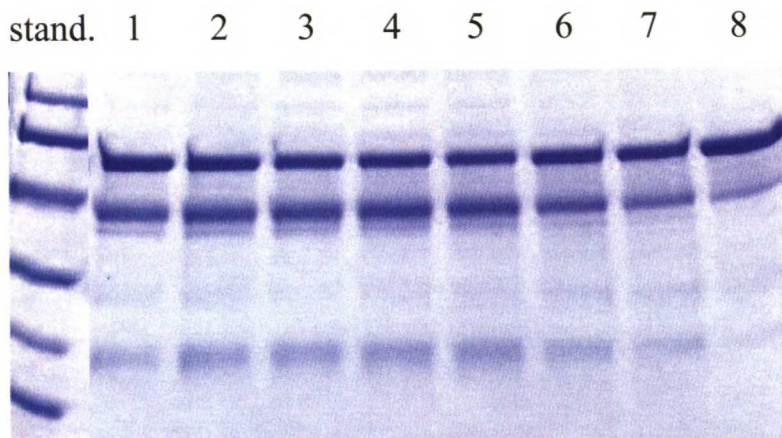
Kuva 17. Lämpötilan vaikutus MBP-H6-AVI -fuusioproteiinin vapaalla kupari(II)ionilla tehtyyn katkaisureaktioon. Näytteitä inkuboitii 20 minuuttia valolta suojattuna. Reaktioliuosten askorbaatti- ja vetyperoksidipitoisuudet olivat 4,6 mM ja 0,35 mM. Inkubointilämpötilat: näyte 1: 0 °C, näyte 2: 10 °C, näyte 3: 20 °C, näyte 4: 30 °C, näyte 5: 40 °C, näyte 6: 50 °C, näyte 7: 60 °C ja näyte 8: 70 °C. Proteiinistandardien molekyylipainot olivat 97, 66, 45, 30, 20 ja 14 kDa.

7.2.3 Reaktiokomponenttien pitoisuudet

Kunkin reaktiokomponentin, kupari(II)ionin, askorbaatin sekä vetyperoksidin, pitoisuuden vaikutusta katkeamisreaktioon tarkasteltiin erikseen.

7.2.3.1 Kuparipitoisuus

Kupari(II)ionipitoisuuden vaikutusta fuusioproteiinin katkaisureaktioon tutkittiin tekemällä katkaisureaktio MBP-H6-AVI -fuusioproteiinilla eri kupari(II)ionipitoisuuksilla. Näytteistä ajettu SDS-PAGE on esitetty kuvassa 18. Geelistä nähtiin että kuparipitoisuuden noustessa katkeamistulos parani, mutta mentäessä 50 ekvivalenttiin tai suurempaan kuparipitoisuuteen katkeamistulos huononi. Paras katkeamistulos saavutettiin kuparipitoisuudella 10 ekvivalenttia. 1000 ekvivalentilla kuparia proteiiniin nähden katkeamista ei juuri ollut tapahtunut. Tämä saattaisi johtua kupari(II)ionien katkaisureaktion kulun kannalta haitallisista vuorovaikutuksista fuusioproteiinin kanssa. Suuri määrä kupari(II)ioneja voi mahdollisesti muodostaa komplekseja fuusioproteiinin ja proteiinifragmenttien kanssa.

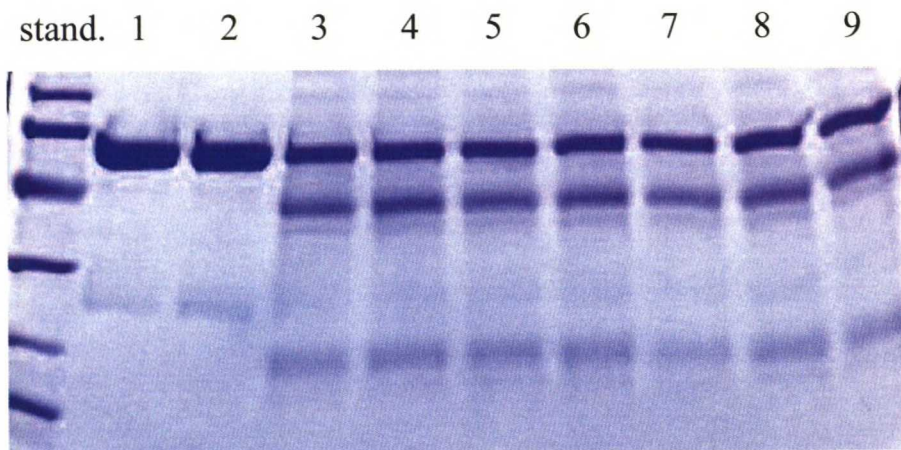


Kuva 18. Kuparipitoisuuden vaikutus MBP-H6-AVI -fuusioproteiinin vapaalla kupari(II)ionilla tehtyyn katkaisureaktioon. Näytteitä inkuboitin huoneenlämmössä 60 minuuttia valolta suojattuna. Reaktioliuosten askorbaatti- ja vetyperoksidipitoisuudet olivat 4,6 mM ja 0,35 mM. Näytteiden kuparipitoisuudet proteiiniin nähden: näyte 1: ½ ekv., näyte 2: 1 ekv., näyte 3: 2 ekv., näyte 4: 5 ekv., näyte 5: 10 ekv., näyte 6: 50 ekv., näyte 7: 100 ekv. ja näyte 8: 1000 ekv. Proteiinistandardien molekyylipainot olivat 97, 66, 45, 30, 20 ja 14 kDa.

7.2.3.2 Askorbaattipitoisuus

Askorbaattipitoisuuden vaikutusta vapaalla kupari(II)ionilla tehtävään fuusioproteiinin katkaisureaktioon tutkittiin tekemällä katkaisureaktio MBP-H6-AVI -fuusioproteiinilla eri askorbaattipitoisuuksilla. Näytteistä ajettu

SDS-PAGE on esitetty kuvassa 19. Geelistä nähtiin että näytteessä 2, jossa askorbaatin pitoisuus oli 0, katkeamista ei ollut tapahtunut. Näytteissä 3-9 ei ollut havaittavissa eroja katkeamistuloksissa. Askorbaattia täytyi siis olla reaktioliuoksessa läsnä, jotta katkeamista tapahtui, mutta askorbaattipitoisuudella ei näyttänyt olevan suurta merkitystä.

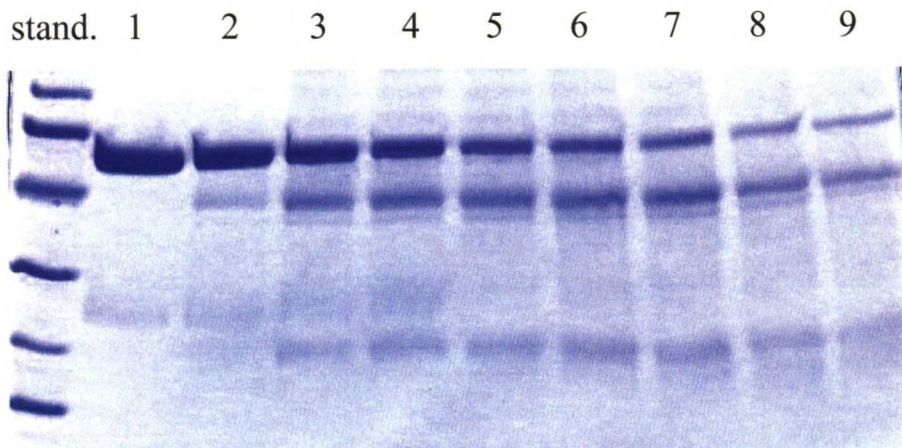


Kuva 19. Askorbaattipitoisuuden vaikutus MBP-H6-AVI -fuusioproteiini vapaalla kupari(II)ionilla tehtyyn katkaisureaktioon. Näytteitä inkuboitii huoneenlämmössä 60 minuuttia valolta suojattuna. Reaktioliuosten vetyperoksidipitoisuus oli 0,35 mM. Näytteiden askorbaattipitoisuudet olivat: näyte 1: ei katkaisua (ei kuparia, vetyperoksidia eikä askorbaattia), näyte 2: 0 mM, näyte 3: 1,1 mM, näyte 4: 2,3 mM, näyte 5: 4,6 mM, näyte 6: 9,1 mM, näyte 7: 18 mM, näyte 8: 37 mM, näyte 9: 73 mM. Proteiinistandardien molekyylipainot olivat 97, 66, 45, 30, 20 ja 14 kDa.

7.2.3.3 Vetyperoksidipitoisuus

Vetyperoksidipitoisuuden vaikutusta vapaalla kupari(II)ionilla tehtävään fuusioproteiinin katkaisureaktioon tutkittiin tekemällä katkaisureaktio MBP-H6-AVI -fuusioproteiinilla eri vetyperoksidipitoisuuksilla. Näytteistä ajettu SDS-PAGE on esitetty kuvassa 20. Geelistä nähtiin että katkaisureaktio oli edennyt sitä pidemmälle mitä korkeampi käytetty vetyperoksidipitoisuus oli ollut. Vetyperoksidipitoisuuden havaittiin siis olevan merkittävämpi katkaisureaktiolle kuin askorbaattipitoisuuden. Katkeamistuotteita oli havaittavissa myös näytteessä 2, jossa vetyperoksidipitoisuus oli 0. Tämä saattaa johtua luvun 4.3.2 yhtälössä (6) esitetystä kemiallisesta reaktiosta, jossa askorbaatin hapettuminen kupari- tai rautaionin läsnäollessa tuottaa vetyperoksidia. Eli vaikka reaktioliuokseen ei

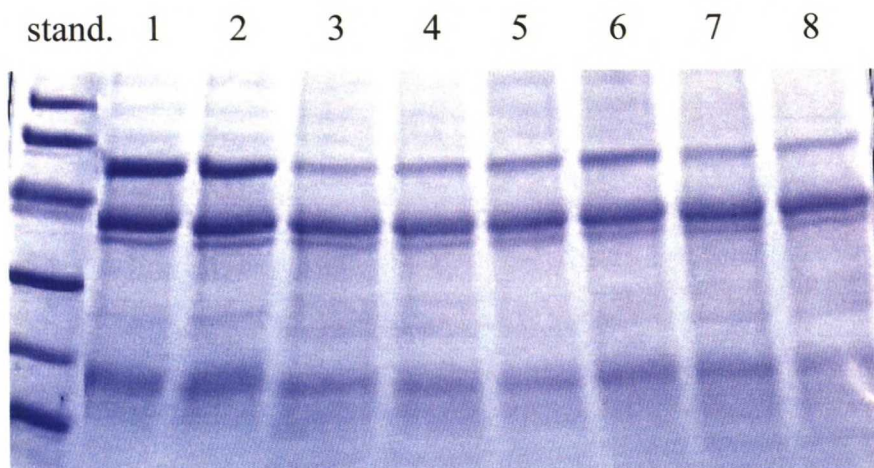
lisättäisikään vetyperoksidia, saattaa sitä muodostua pieniä määriä askorbaatin hapettuessa kupari(II)ionin läsnäollessa.



Kuva 20. Vetyperoksidipitoisuuden vaikutus MBP-H6-AVI -fuusioproteiinin vapaalla kupari(II)ionilla tehtyyn katkaisureaktioon. Näytteitä inkuboitii huoneenlämmössä 60 minuuttia valolta suojattuna. Reaktioliuosten askorbaattipitoisuus oli 4,6 mM. Näytteiden vetyperoksidipitoisuudet olivat: näyte 1: ei katkaisua (ei kuparia, ei vetyperoksidia eikä askorbaattia), näyte 2: 0 mM, näyte 3: 0,09 mM, näyte 4: 0,17 mM, näyte 5: 0,35 mM, näyte 6: 0,69 mM, näyte 7: 1,4 mM, näyte 8: 2,8 mM, näyte 9: 5,5 mM. Proteiinistandardien molekyylipainot olivat 97, 66, 45, 30, 20 ja 14 kDa.

7.2.4 Parhaat olosuhteet

Kun vapaalla kupari(II)ionilla tehtävään katkaisureaktioon vaikuttavien olosuhteiden ja pitoisuuksien vaikutus oli selvitetty, tehtiin katkaisureaktio saavutetuilla parhailla olosuhteilla ja pitoisuuksilla. Näytteistä ajettu SDS-PAGE on esitetty kuvassa 21. Geelistä nähtiin että parhailla olosuhteilla tehdyn katkaisureaktion tulos oli huonompi kuin kontrollina käytetyn tyypillisen eksperimentin mukaisen katkaisureaktion tulos. Fuusioproteiinin määrä oli parhailla olosuhteilla tehdyssä katkaisureaktiossa huomattavasti pienempi kuin kontrollinäytteessä, mutta katkaisutuotteiden, erityisesti streptavidinin, määrä oli pienempi kuin kontrollinäytteessä.



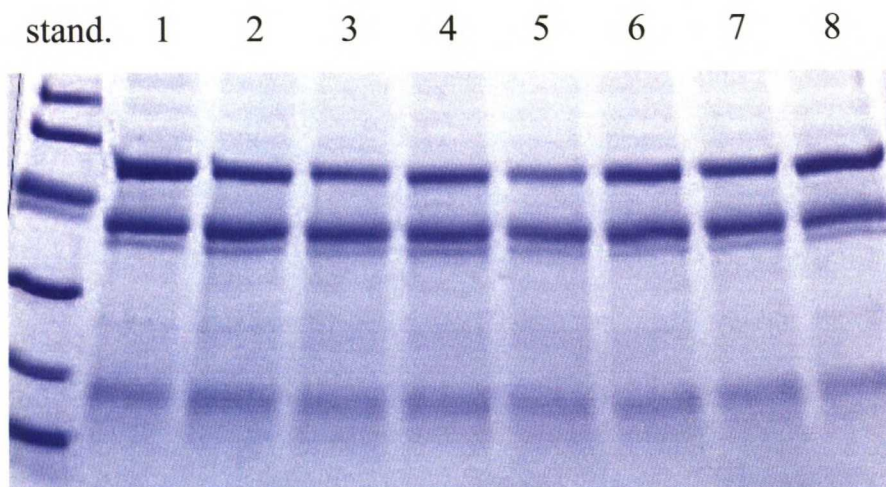
Kuva 21. Määritetyillä parhailla olosuhteilla tehty katkaisureaktio. Kaikkien reaktioliuosten askorbaattipitoisuus oli 4,6 mM ja näytteitä inkuboitin valolta suojattuna. Näytteet 1 ja 2 olivat kontrollinäytteitä, joissa käytetyt fuusioproteiinit olivat MBP-H6-AVI ja MBP-H8-AVI. Näytteitä 1 ja 2 inkuboitin huoneenlämmössä 60 min, vetyperoksidipitoisuus oli 0,35 mM, kuparipitoisuus 1 ekv. ja puskuri NaOAc pH 5,0. Näytteissä 3-8 käytettiin MBP-H8-AVI -fuusioproteiinia, vetyperoksidipitoisuus oli 0,69 mM, kuparipitoisuus 10 ekv. ja puskuri sitraatti pH 6,0. Näytteitä 3 ja 4 inkuboitin huoneenlämmössä 60 min, näytteitä 5 ja 6 30 °C:ssa 20 min ja näytteitä 7 ja 8 30 °C:ssa 60 min. Proteiinistandardien molekyylipainot olivat 97, 66, 45, 30, 20 ja 14 kDa.

Parannusta katkaisureaktioon ja sen saantoon ei siis saavutettu parhaita olosuhteita yhdistämällä. Syytä tähän on vaikea sanoa. Tutkitut olosuhteet ja niiden vaikutukset katkaisureaktioon eivät olleet additiivisia. Oletettavaa olisi ollut että, katkaisutulos olisi parantunut tai vähintäänkin pysynyt samana. Katkaisutuloksen huononeminen oli yllättävää. Reaktion tarkka toimintaperiaate on siis tuntematon, mikä on sovellusten kannalta huono asia.

7.2.5 Kupari(II)ioni, askorbaatti ja vetyperoksidi -tehosteet

Vapaalla kupari(II)ionilla tehtävän fuusioproteiinin katkaisureaktion saantoa koetettiin parantaa lisäämällä katkaisureaktioluokseen kupari(II)ioni-, askorbaatti- ja vetyperoksiditehosteita ja toistamalla inkubointi. Reaktioluokset tehostettiin joko kerran tai kaksi kertaa. Näytteistä ajettu SDS-PAGE on esitetty kuvassa 22. Geelistä nähtiin että kerran tehostetuissa näytteissä jäljelle jääneen katkeamattoman fuusioproteiinin määrä oli hieman pienentynyt ja kaksi kertaa tehostetuissa näytteissä se oli pienentynyt lisää. Eniten katkeamattoman fuusioproteiinin määrän pienentymistä oli tapahtunut näytteissä jotka oli

tehostettu kaksi kertaa askorbaatti+H₂O₂ ja kupari+askorbaatti+H₂O₂ -tehosteilla. Näissä näytteissä streptavidinijuova oli puolestaan hieman pienempi kuin kontrollinäytteissä. MBP- ja streptavidinikatkaisutuotteiden määrä ei ollut lisääntynyt missään näytteissä.



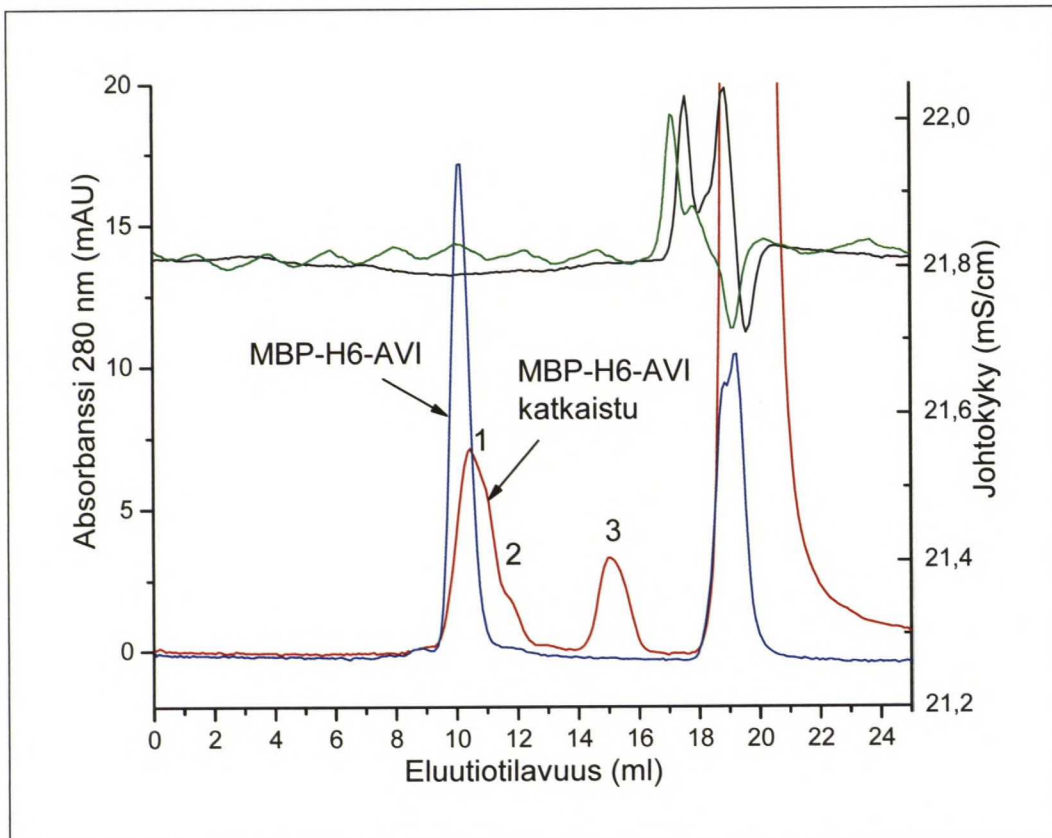
Kuva 22. Kupari(II)ioni, askorbaatti ja vetyperoksidi -tehosteiden vaikutus vapaalla kupari(II)ionilla tehtyyn MBP-H6-AVI -fuusioproteiinin katkaisureaktioon. Näytteitä inkuboitii huoneenlämmössä 60 minuuttia valolta suojattuna. Näytteet 1 ja 8 olivat kontrollinäytteitä ja niissä katkaisureaktio suoritettiin normaalisti. Näytteitä 2 ja 3 tehostettiin askorbaatti+H₂O₂ -tehosteilla: näytettä 2 kerran ja näytettä 3 kaksi kertaa. Näytteitä 4 ja 5 tehostettiin kupari+askorbaatti-H₂O₂ -tehosteilla: näytettä 4 tehostettiin kerran ja näytettä 5 kaksi kertaa. Näytteitä 6 ja 7 tehostettiin kuparitehosteilla: näytettä 6 kerran ja näytettä 7 kaksi kertaa. Lopulliset kupari-, askorbaatti- ja vetyperoksidipitoisuudet tehostetuissa näytteissä olivat: näyte2: 3,3 µM; 9,14 mM; 0,69 mM; näyte 3: 3,3 µM; 14 mM; 1,04 mM; näyte 4: 6,5 µM; 9,1 mM; 0,69 mM; näyte 5: 9,7 µM; 14 mM; 1,04 mM; näyte 6: 6,5 µM; 4,6 mM; 0,35 mM ja näyte 7: 9,7 µM; 4,6 mM; 0,35 mM. Proteiini-standardien molekyylipainot olivat 97, 66, 45, 30, 20 ja 14 kDa.

Katkeamisreaktiota tehostamalla, tuomalla tuoreita reagensseja reaktioliuokseen, ei saatu parempaa katkeamistulosta. Fuusioproteiinin määrän pienentyminen osoitti että katkeamista oli luultavasti tapahtunut tehostetuissa näytteissä enemmän kuin tehostamattomissa. Tehosteiden aikaansaaneen katkeamisen on kuitenkin täytynyt olla epäspesifistä, koska katkeamistuotteiden määrä ei ollut lisääntynyt. Tehostaminen tässä koesarjassa toistettiin vain kaksi kertaa, mikä ei välttämättä vielä tuo esille tehosteiden katkeamista edistävää vaikutusta, vaan tehostaminen olisi syytä toistaa useampia kertoja.

7.3 Katkeamiskohta

7.3.1 Geelisuodatus

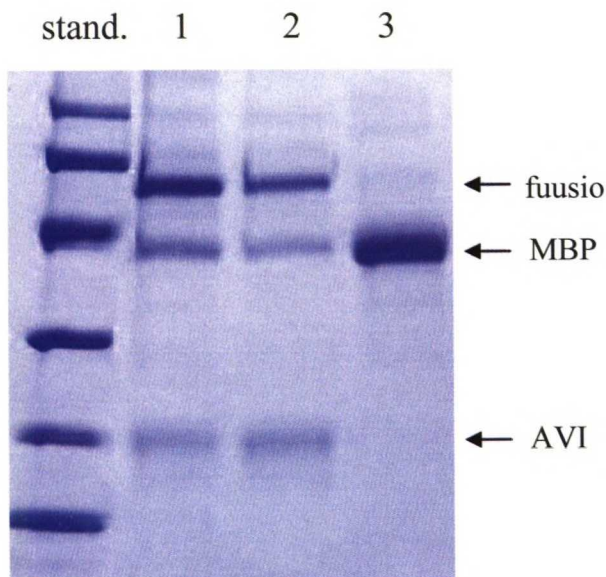
Tarkan katkeamiskohdan selvittämiseksi vapaalla kupari(II)ionilla tehdyn katkaisureaktion katkeamistuotteet pyrittiin puhdistamaan N-terminaalista sekvennointia sekä massa-analyysiä varten. MBP-H6-AVI -fuusioproteiinin katkeamistuotteet erotettiin toisistaan Superdex 200 -geelisuodatuksella. Eluaatin absorbanssi aallonpituudella 280 nm sekä johtokyky eluotitilavuuden funktiona on esitetty kuvaajassa 1. Kuvaajasta nähtiin että puhtaalla MBP-H6-AVI -fuusioproteiinilla saatiin yksi piikki eluotitilavuudella n. 10,5 ml. Saman fuusioproteiinin katkaisutuotteina saatiin kolme piikkiä eluotitilavuuksilla n. 10,5; 12 sekä 15 ml. Eluotitilavuudella n. 20 ml nähtävät suuret piikit molemmissa näytteissä johtuivat askorbaatista, joka eluoitui vesipiikissä.



Kuvaaja 1. MBP-H6-AVI -fuusioproteiinin vapaalla kupari(II)ionilla tehdyn katkaisureaktion katkaisutuotteiden erotus Superdex 200 -geelisuodatuksella. Eluaatin absorbanssi aallonpituudella 280 nm sekä johtokyky eluotitilavuuden funktiona.

Geelisuodatusfraktiot konsentroitiin TCA-DOC -saostuksella ja fraktioiden proteiinit identifioitiin SDS-PAGE:lla, joka on esitetty kuvassa 23. Vertaamalla geelisuodatukselta saatua A_{280} -käyrää sekä SDS-PAGE -geeliä, nähtiin että piikki 1 oli katkeamaton fuusioproteiini, piikki 2 oli fuusioproteiini, josta osa MBP:sta oli irronnut, ja piikki 3 oli MBP.

SDS-PAGE-näytteiden denaturoinnissa streptavidiinin tetrameeri purkautuu ja geelissä näkyvät vain monomeerit. Yhdessä fuusioproteiinitetrameerissä on yksi MBP jokaista neljää streptavidiinimonomeeriä kohden. Fuusioproteiinitetrameeristä, josta osa MBP:sta on katkennut, tulisi SDS-PAGE:ssa näkyä fuusioproteiini- ja streptavidiini-juova. Kuvan 23 geelistä kuitenkin nähtiin että proteiinipiikeissä 1 ja 2 oli myös havaittavissa MBP-proteiini-juova. Osa irrallisesta MBP:sta eluoitui siis fuusioproteiinin mukana geelisuodatuksessa. Valtaosa irrallisesta MBP:sta eluoitui kuitenkin omana piikkinä. Geelisuodatuksella ei myöskään saatu erilleen streptavidiinia, josta kaikki MBP:t olisivat katkenneet.



Kuva 23. Geelisuodatuksella erotettujen MBP-H6-AVI -fuusioproteiinin vapaalla kupari(II)ionilla tehdyssä katkaisureaktiossa syntyneiden proteiinifragmenttien identifiointi SDS-PAGE:lla. Näytteet 1, 2 ja 3 ovat geelisuodatuksen vastaavien piikkien TCA-DOC-saostuksella konsentroidut fraktiot. Proteiinistandardien molekyylipainot olivat 97, 66, 45, 30, 20 ja 14 kDa.

Piikin 3 sisältämä MBP-määrä (g) arvioitiin kaavalla (9) ja piikin sisältämän MBP:n ainemäärä (mol) saatiin jakamalla proteiinimäärä proteiinin molekyylipainolla.

$$m_{MBP} = \frac{3,3mAU \cdot 2ml}{2} = \frac{3,3\mu g / ml \cdot 2ml}{2} = 3,3\mu g$$

$$n_{MBP} = \frac{3,3\mu g}{41400g / mol} = 0,0797nmol$$

Geelisuodatusnäytteenä käytetyn katkaisureaktioliuoksen fuusioproteiinipitoisuus (mol/l) laskettiin kaavalla (10) ja geelisuodatusnäytteen sisältämän MBP:n ainemäärä (mol) kaavalla (11)

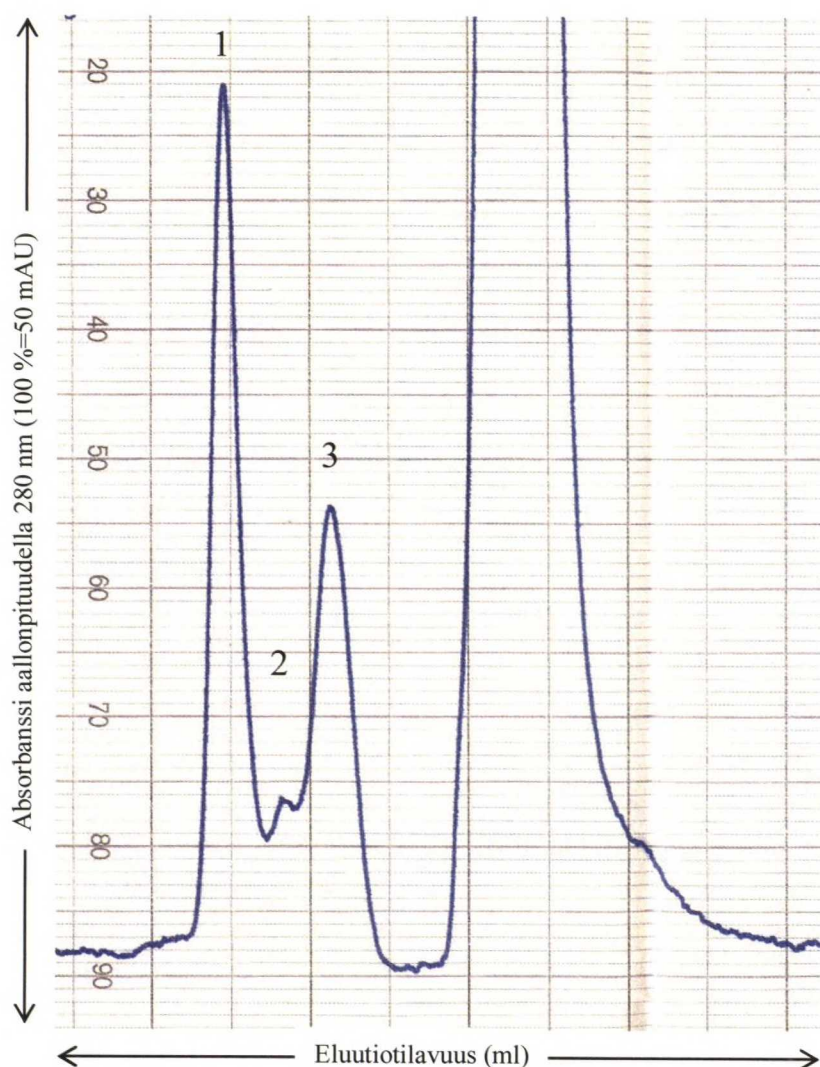
$$c_{\text{fuusioproteiini}}^{\text{katkaisureaktioliuos}} = \frac{19,2\mu mol / l \cdot 18\mu l}{117\mu l} = 2,95384\mu mol / l$$

$$n_{MBP}^{\text{geelisuodatusnäyte}} = n_{\text{fuusioproteiini}}^{\text{geelisuodatusnäyte}} = 2,95384\mu mol / l \cdot 86\mu l = 0,25403nmol$$

MBP-saanto (%) saatiin vertaamalla geelisuodatuspiikin sisältämää MBP:n ainemäärää geelisuodatuksella analysoidun näytteen sisältämään MBP-ainemäärään kaavalla (12).

$$MBP - saanto = \frac{0,0797nmol}{0,25403nmol} = 0,3138 = 31\%$$

Myös MBP-H6-SSO2 -fuusioproteiinin katkeamistuotteet erotettiin toisistaan Superdex 200 -geelisuodatuksella. Eluaatin absorbanssi aallonpituudella 280 nm sekä johtokyky eluointilavuuden funktiona on esitetty kuvaajassa 2. Kuvaajasta nähtiin että MBP-H6-SSO2 -fuusioproteiinin katkaisutuotteina saatiin kolme proteiinipiikkiä sekä suuri askorbaattipiikki kuten kuvaajassa 1.

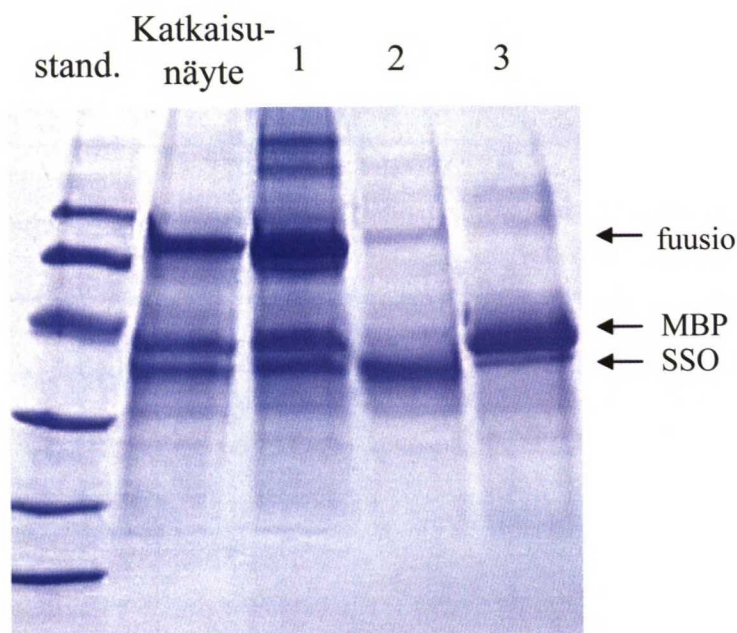


Kuvaaja 2. MBP-H6-SSO2 -fuusioproteiinin vapaalla kupari(II)ionilla tehdyn katkaisureaktion katkaisutuotteiden erotus Superdex 200 -geelisuodatuksella. Eluaatin absorbanssi aallonpituudella 280 nm eluutiotilavuuden funktiona.

Geelisuodatusfraktiot konsentroitiin jälleen TCA-DOC -saostuksella ja fraktioiden proteiinit identifioitiin SDS-PAGE:lla, joka on esitetty kuvassa 24. Vertaamalla geelisuodatuksesta saatua A_{280} -käyrää sekä SDS-PAGE -geeliä, nähtiin että piikki 1 oli katkeamaton fuusioproteiini, piikki 2 oli SSO2-katkeamistuote ja piikki 3 MBP-katkeamistuote.

SSO2-proteiini on molekyylipainoltaan 31,2 kDa ja MBP 41,4 kDa. SSO2- ja MBP-katkeamistuotteet eluoituivat geelisuodatuksessa molekyylipainonsa mukaan käänteisessä järjestyksessä. MBP-H6-SSO2 -fuusioproteiini sisältää

MBP- ja SSO2-proteiineja moolisuhteessa 1:1. Geelisuodatuksessa detektoitu SSO2-piikki oli kuitenkin huomattavasti MBP-piikkiä pienempi.



Kuva 24. Geelisuodatuksella erotettujen MBP-H6-SSO2 -fuusioproteiinin vapaalla kupari(II)ionilla tehdyssä katkaisureaktiossa syntyneiden proteiinifragmenttien identifiointi SDS-PAGE:lla. Katkaisunäyte on näyte katkaisuliuksesta ennen geelisuodatusta. Näytteet 1, 2 ja 3 ovat geelisuodatuksen vastaavien piikkien TCA-DOC-saostuksella konsentroidut fraktiot. Proteiinistandardien molekyylipainot olivat 97, 66, 45, 30, 20 ja 14 kDa.

MBP-H6-SSO2 -fuusioproteiini on monomeeri. Näin ollen katkeamaton fuusioproteiini pitäisi näkyä SDS-PAGE:ssa yhtenä suurimolekyylisenä proteiinijuovana. Kuvan 24 geelistä kuitenkin nähtiin että proteiinipiikissä 1 oli myös havaittavissa sekä SSO2- että MBP-proteiinijuovat. Osa irrallisesta SSO2- sekä MBP-katkeamistuotteesta eluoitui siis jälleen fuusioproteiinin mukana geelisuodatuksessa. Valtaosa irrallisista SSO2:sta ja MBP:sta eluoitui kuitenkin omina piikkeinään. Näytteessä 1 oli myös nähtävissä kaksi fuusioproteiinia selvästi molekyylipainoltaan suuremman proteiinin aiheuttamaa proteiinijuovaa. Nämä olivat todennäköisesti SSO2- ja MBP-proteiinifragmenttien ja katkeamattoman fuusioproteiinin keskinäisestä vuorovaikutuksesta aiheutuneita komplekseja.

7.3.2 Ioninvaihto

MBP-H6-AVI sekä MP-H6-SSO2 -fuusioproteiinien katkeamistuotteet erotettiin Mono Q -ioninvaihdolla. Ioninvaihdossa aallonpituudella 280 nm saatujen piikkien määrä oli hyvin suuri eikä vastannut erikokoisten proteiinifragmenttien oletettua määrää katkaisuliuksessa. Piikkien suuri määrä saattoi johtua katkeamistuotteiden sisältämien histidiinitähteiden mahdollisesta vaihtelevasta määrästä. Histidiini on varauksellinen aminohappo ja näin ollen jokaisella eripituisen histidiinilinkkerin omaavalla proteiinifragmentilla on eri isoelektrinen piste (pI), jonka mukaan proteiinit erottuvat ioninvaihdossa. Ioninvaihto ei myöskään ollut kvantitatiivinen, vaan suuri määrä proteiinia tarttui käytettyyn ioninvaihtopylvääseen ja eluoiutui seuraavien ajojen aikana. Myös menetelmän toistettavuus oli huono, koska lähes jokaisesta ioninvaihdosta saatu A₂₈₀-käyrä oli erilainen. Ioninvaihdossa saaduista proteiinipiikeistä tehtiin dot blot -vasta-ainevärjäys proteiinipiikkien tunnistamiseksi. Värjäyksellä ei kuitenkaan saatu luotettavasti selville piikkien sisältämiä proteiineja.

7.3.3 Katkeamistuotteiden N-terminaalinen sekvenssi

Käytettyjen fuusioproteiinien MBP-katkeamistuotteiden sekä katkeamattoman MBP-H6-SSO2 -fuusioproteiinin N-terminusten todettiin olevan intaktit. MBP-H6-AVI, MBP-H8-AVI ja MBP-H6-SSO2 -fuusioproteiinien MBP-katkeamistuotteiden N-terminaalisen sekvenssin todettiin olevan MKIEEGK, joka oli sama kuin fuusioproteiinin transformaation yhteydessä sekvensoitu tulos. Myös katkeamattoman MBP-H6-SSO2 -fuusioproteiinin N-terminaaliseksi sekvenssiksi saatiin MKIEEGK. Fuusioproteiinin vapaalla kupari(II)ionilla tapahtuvassa katkeamisreaktiossa proteiinin N-terminuksen todettiin siis jääneen ehjäksi, jolloin kaikki proteiiniin kohdistuva pilkkoutuminen oli tapahtunut C-terminaalisisesta päästä.

SSO2-katkeamistuotteen N-terminaalisella sekvensoinnilla ei yrityksestä huolimatta saatu tulosta. Tämä saattoi johtua siitä, että SSO2-reaktiotuotteen N-terminaali blokkautui automaattista sekvensointia ajatellen. Edman

sekvensointi tarvitsee toimiakseen vapaan aminoryhmän proteiinin N-terminaaliseen päähän. Jos vapaata aminoryhmää ei ole, sekvensoinnilla ei saada tulosta. Mikäli vapaalla kupari(II)ionilla tapahtuva katkeamisreaktio on luvun 4.3.1 mukaisen Fentonkemian aikaansaama radikaalireaktio, voi fuusioproteiinin peptidiketju pilkkoutua siten, että vapaata aminoryhmää ei katkeamistuotteen päähän muodostu. SSO2-katkeamistuotteen N-terminaalisen sekvensoinnin epäonnistuminen saattoi johtua myös heterogeenisestä N-terminuksesta. Tällöin kunkin erilaisen SSO2-katkeamistuotteen osapitoisuudet todennäköisesti jäisivät niin alhaisiksi, ettei Edman sekvensoinnilla saataisi tulosta. Edman sekvensoinnin epäonnistuminen saattoi myös johtua analysoitujen näytteiden liian pienistä SSO2-pitoisuuksista yleensä.

7.3.4 Katkeamistuotteiden molekyylipaino

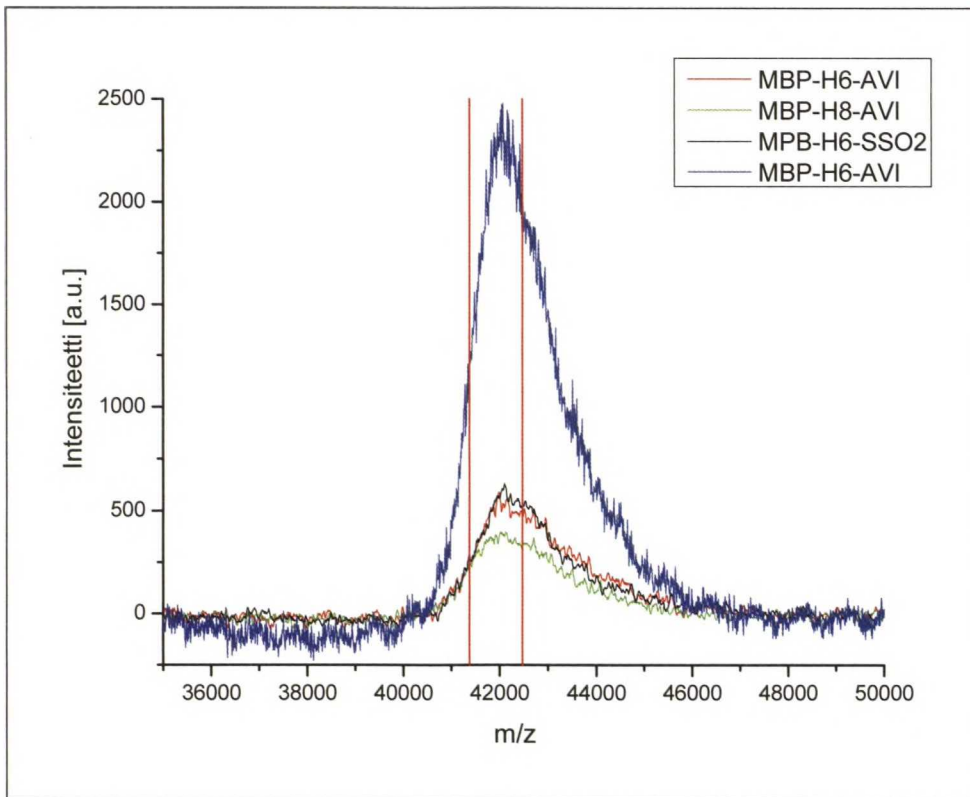
Katkeamistuotteille MALDI-TOF massaspektrometrillä saadut molekyylipainot on esitetty taulukossa 13. Taulukon tuloksista nähtiin, että katkeamistuotteille saatiin keskimääräiset massat 41946 ja 31174 Da ja katkeamattomalle fuusioproteiinille 73164 Da, joka on sama kuin katkeamistuotteiden yhteenlaskettu massa virherajat (± 300 Da) huomioon ottaen. Tuloksista nähtiin että MBP-katkeamistuotteelle saadut massat vaihtelivat eniten: 41800–42101 Da välillä. Vaihtelu mahtui kuitenkin annettujen virherajojen sisälle. SSO2-katkeamistuotteen massat vaihtelivat 31002–31335 Da välillä ja katkeamattoman MBP-H6-SSO2-fuusioproteiinin massat 73111–73212 Da välillä.

Taulukko 13. Vapaalla kupari(II)ionilla tehdyn fuusioproteiinin katkaisureaktion reaktioluokkomponenttien molekyyliainot MALDI-TOF massaspektrometrillä sekä N-terminaalit sekvenssit. (MALDI-TOF massaspektrometrin virhe ± 300 Da; Da=g/mol).

Tutkittu katkeamistuote	Fuusioproteiini	Näyte	N-terminaalinen sekvenssi	Molekyyliaino (Da)	Keskiarvo (Da)
MBP	MBP-H6-AVI		MKIEEGK...	42 070	
	MBP-H6-AVI		MKIEEGK...	41 988	
	MBP-H8-AVI		MKIEEGK...	42 012	
	MBP-H6-SSO2		MKIEEGK...	42 101	
	MBP-H6-SSO2	RPC fraktio 29	-	41 967	
	MBP-H6-SSO2	RPC fraktio 30	-	41 800	
	MBP-H6-SSO2	RPC fraktio 2	MKIEEGK...	41 816	
	MBP-H6-SSO2	RPC fraktio 3	MKIEEGK...	41 816	41 946
SSO2	MBP-H6-SSO2	RPC fraktio 30	-	31 335	
	MBP-H6-SSO2	RPC fraktio 31	-	31 002	
	MBP-H6-SSO2	RPC fraktio 3	Ei tulosta	31 221	
	MBP-H6-SSO2	RPC fraktio 4	Ei tulosta	31 207	
	MBP-H6-SSO2	RPC fraktio 5	-	31 105	31 174
MBP-H6-SSO2	MBP-H6-SSO2	RPC fraktio 30	-	73 111	
	MBP-H6-SSO2	RPC fraktio 31	-	73 200	
	MBP-H6-SSO2	RPC fraktio 4	MKIEEGK...	73 212	
	MBP-H6-SSO2	RPC fraktio 5	-	73 134	73 164

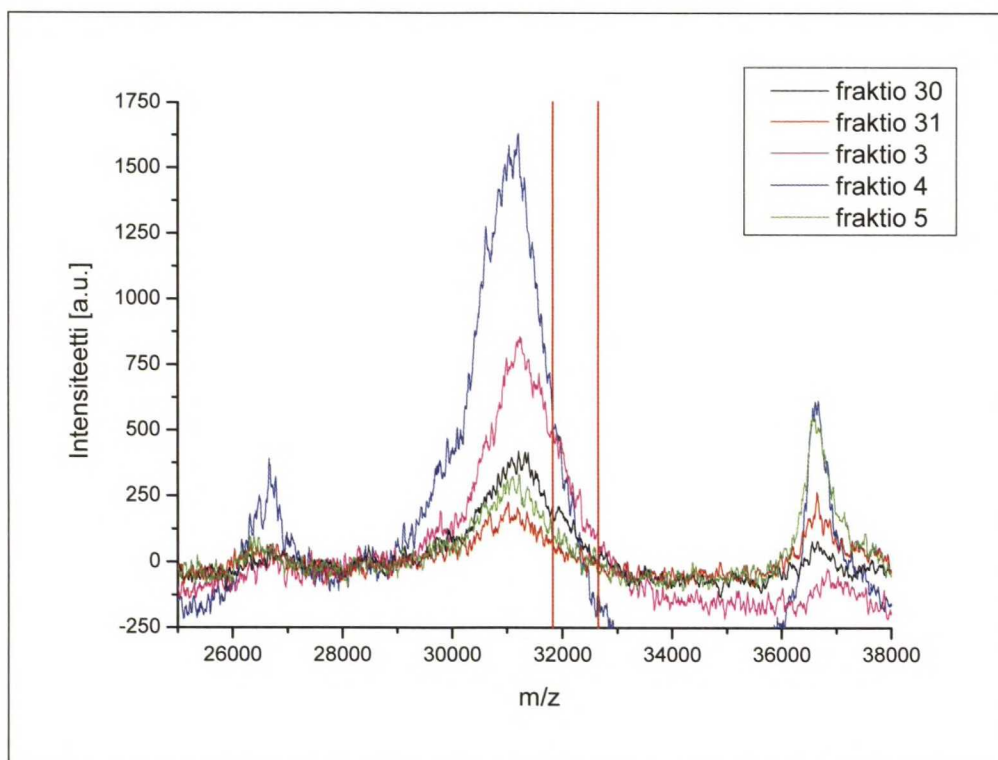
Kuvaajissa 3, 4 ja 5 on esitetty MALDI-TOF MS -molekyyliainokuvaajat päällekkäin aseteltuna kunkin reaktiotuotteen suhteen. Piikkien keskinäiset korkeuserot johtuvat näytteiden analyysissä antamien intensiteettien eroista ja piikkien leveys on korostunut akselivalinnasta johtuen. Kaikki katkeamistuotteille saadut MALDI-TOF MS -molekyyliainokuvaajat on esitetty liitteissä 2 ja 3.

Kuvaajassa 3 on esitetty MBP-H6-AVI, MBP-H8-AVI ja MBP-H6-SSO2 -fuusioproteiinien katkaisureaktioluoksista puhdistettujen MBP-katkeamistuotteiden MALDI-TOF MS -molekyyliainokuvaajat. Kuvaajaan on merkitty punaisilla palkeilla massat 41374 ja 42471 Da, jotka kuvaavat 0 histidiiniä ja 8 histidiiniä sisältäviä MBP:ja. Kuvaajasta nähtiin että kaikkien neljän näytteen molekyyliainopiikkien huiput osuivat peptidilinkkerin histidiinialueen reunoja kuvaavien palkkien väliin. Katkeaminen oli siis kaikissa näytteissä tapahtunut fuusioproteiinin histidiinialueelta, kun N-terminuksen tiedettiin olevan intakti. Q-TOF ESI massaspektrometrillä näistä näytteistä ei saatu yrityksistä huolimatta tulosta. MBP-näytteet eivät ionisoituneet Q-TOF ESI massaspektrometrissä johtuen mahdollisesti proteiinin liian suuresta happamuudesta.



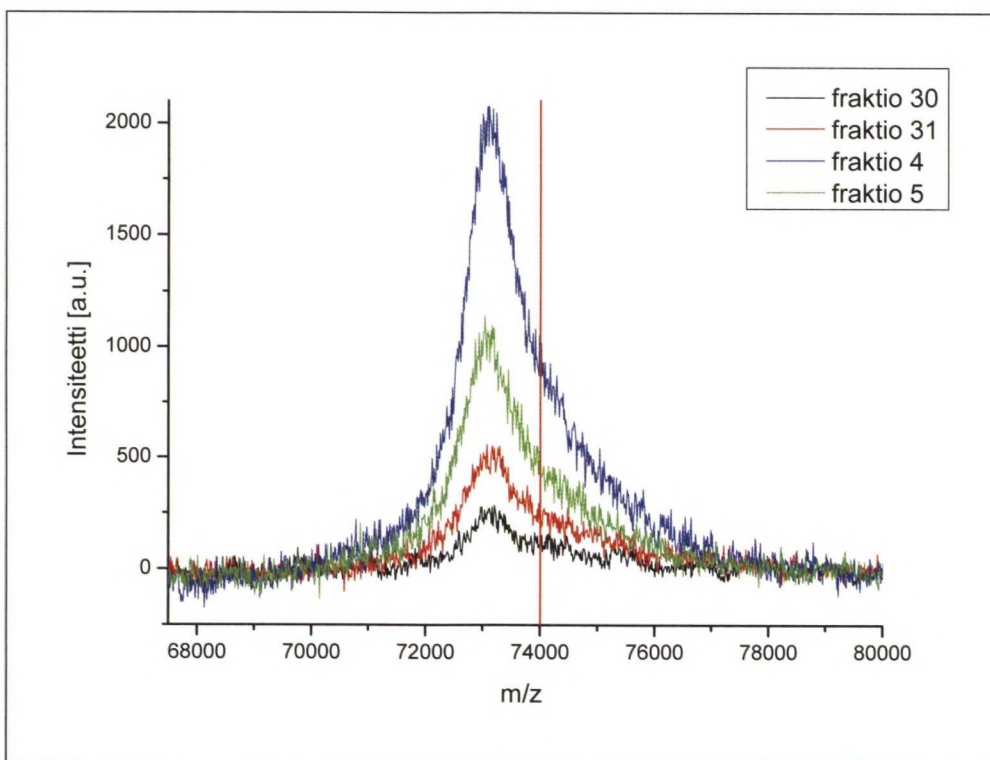
Kuvaaja 3. Vapaalla kupari(II)ionilla tehdyn fuusioproteiinin katkaisureaktion MBP-katkeamistuotteen MALDI-TOF MS -molekyylipainokuvaajat. Kuvan punaisten palkkien väliin jäävä alue kuvaa fuusioproteiinin peptidlinkkerin histidiinialuetta.

Kuvaajassa 4 on esitetty MBP-H6-SSO2 -fuusioproteiinin katkaisureaktion reaktioliuoksesta MALDI massaspektrometrillä saatujen molekyylipainokuvaajien SSO2-molekyylipainopiikit. Kuvaajaan on merkitty punaisilla palkeilla massat 31827 ja 32650 Da, jotka kuvaavat 0 histidiiniä ja 6 histidiiniä sisältäviä SSO2-proteiineja. Kuvaajassa 5 puolestaan on esitetty samojen molekyylipainokuvaajien katkeamattoman MBP-H6-SSO2 -fuusioproteiinin aiheuttamat molekyylipainopiikit. Kuvaajaan on merkitty punaisella palkilla massa 74005 Da, joka kuvaa fuusioproteiinin oletettua molekyylipainoa.



Kuvaaja 4. Vapaalla kupari(II)ionilla tehdyn MBP-H6-SSO2 -fuusioproteiinin katkaisureaktion reaktioluoksesta saatujen MALDI-TOF MS -molekyylipainokuvaajien SSO2-molekyylipainopiikit. Kuvan punaisten palkkien väliin jäävä alue kuvaa fuusioproteiinin peptidlinkkerin histidiinialuetta.

Kuvaajasta 4 nähtiin että saatujen proteiinipiikkien huiput eivät osuneet peptidlinkkerin histidiinialueen reunoja kuvaavien palkkien väliin. Saatut piikit olivat keskenään samassa linjassa noin 31174 Da:n kohdalla, mutta siirtymää histidiinialueelta oli noin 1000 Da. Samansuuruinen siirtymä oli havaittavissa kuvaajassa 5. Myös kuvaajassa 5 nähdyt piikit olivat keskenään samassa linjassa noin 73164 Da:n kohdalla.

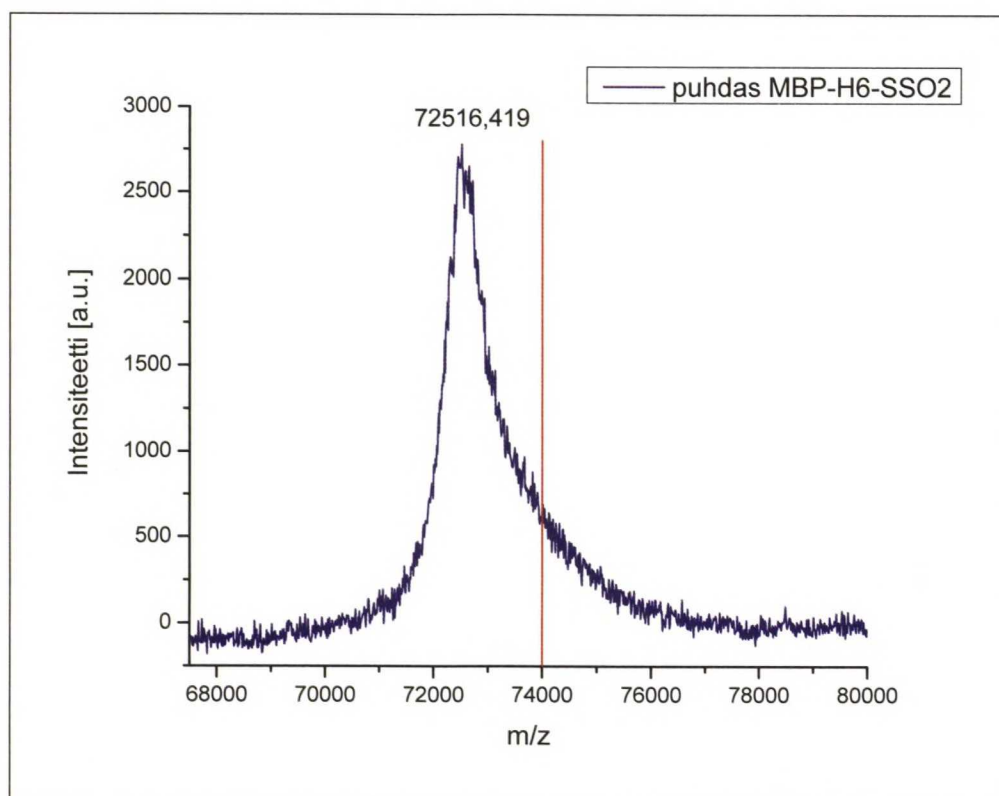


Kuvaaja 5. Vapaalla kupari(II)ionilla tehdyn MBP-H6-SSO2 -fuusioproteiinin katkaisureaktion reaktioliuoksesta saatujen MALDI-TOF MS -molekyylipainokuvaajien katkeamattoman fuusioproteiinin molekyylipainopiikit. Kuvan punainen palkki kuvaa fuusioproteiinin oletettua massaa.

Kuvaajissa 4 ja 5 nähdyt siirtymät molekyylipainopiikeissä olivat todennäköisesti seurausta proteiinin ei-toivotusta C-terminaalista pilkkoutumisesta. Vaje SSO2-katkeamistuotteen sekä katkeamattoman MBP-H6-SSO2 -fuusioproteiinin massoissa oli yhtä suuri, n. 1000 Da, joka tarkoitti seitsemän aminohapon vajetta. Sekä MBP-katkeamistuotteen että katkeamattoman MBP-H6-SSO2 -fuusioproteiinin N-terminuksen oli todettu olevan ehjä sekä MBP-katkeamistuotteiden massat osoittivat katkeamisen tapahtuneen histidiinialueelta. Tällöin fuusioproteiini oli todennäköisesti katkennut myös C-terminaalista päästä irrottaen 7 aminohapon pituisen fragmentin.

C-terminuksen katkeaminen oli saattanut tapahtua jo fuusioproteiinin tuoton aikana proteaasien vaikutuksesta, mutta myös kupari(II)ionilla tehdyssä katkaisureaktiossa katkeaminen sekundäärisestä katkeamiskohdasta läheltä C-terminusta oli mahdollista. Virhe fuusioproteiinin koossa oli voinut aiheutua myös fuusioproteiinin geenistä. Katkeamisen ajankohdan selvittämiseksi puhtaan

MBP-H6-SSO2 -fuusioproteiinin molekyylipaino määritettiin MALDI-TOF massaspektrometrialla. Saatua molekyylipainokuvaaja on esitetty kuvaajassa 6 sekä kokonaisuudessaan liitteessä 4. Kuvaajasta nähtiin että puhtaalle MBP-H6-SSO2 -fuusioproteiinille saatiin molekyylipaino 72516 Da. Tämä poikkesi huomattavasti katkeamattomalle fuusioproteiinille saadusta 73164 Da:n keskimääräisestä molekyylipainosta sekä fuusioproteiinin oletetusta 74005 Da:n molekyylipainosta. Puhtaalle MBP-H6-SSO2 -fuusioproteiinille saatu molekyylipaino oli n. 650 Da pienempi kuin katkaisureaktiossa katkeamattoman fuusioproteiinin massa sekä n. 1500 Da pienempi kuin fuusioproteiinin oletettu massa. Saatujen arvojen vaihtelu ei mahtunut annettuihin ± 300 Da -virherajoihin.



Kuvaaja 6. Puhtaan *E. coli* -bakteerissa tuotetun MBP-H6-SSO2 -fuusioproteiinin MALDI-TOF MS -molekyylipainokuvaaja. Kuvan punainen palkki kuvaa fuusioproteiinin oletettua massaa.

Puhtaan fuusioproteiinin ja katkaisureaktiossa katkeamattoman fuusioproteiinin massojen poikkeavuuden vuoksi, määritykset olisi syytä toistaa. Katkaisureaktiossa katkeamattoman fuusioproteiinin massa analysoitiin neljästä

rinnakkaisesta näytteestä, mutta puhtaan fuusioproteiini massa-analyysi tehtiin vain kerran. Satunaisen virheen mahdollisuus on siksi olemassa. Saaduista MBP-H6-SSO2 -fuusioproteiinin molekyylipainoista voitiin kuitenkin päätellä että fuusioproteiini oli oletettua lyhyempi jo ennen katkaisueksperimenttejä. Fuusioproteiinin massan virhe aiheutui siis joko fuusioproteiinin geenistä tai fuusioproteiinin pilkkoutumisesta proteaasien vaikutuksesta tuoton aikana. Ylimääräistä C-terminuksen pilkkoutumista ei siis katkaisureaktiossa mitä todennäköisimmin tapahtunut.

8 JOHTOPÄÄTÖKSET

Tutkittu vapaalla kupari(II)ionilla tapahtuva fuusioproteiinin katkaisureaktio muistuttaa monelta osin kirjallisuudessa käsiteltyjä kupari-ionin aiheuttamia proteiinien degradatiivisia reaktioita. Tämän työn kokeellisessa osassa tutkitussa fuusioproteiinin katkaisureaktiossa katkeamista saavutettiin minuuteissa samoin kuten Chiou (1983) tutkimuksissa. Chioun tutkimuksissa proteiini tuhoutui täysin kupari-ionin ja askorbaatin reaktiossa minuuteissa. Tällaista ei tämän työn kokeellisessa osassa tutkitussa reaktiossa havaittu. Ilman suolaa tehdyissä katkaisureaktioissa havaittiin fuusioproteiinin lähes täydellinen hajoaminen tunnin inkuboinnin jälkeen ja proteiinijuovia oli nähtävissä koko näytteen kulkemalla matkalla, mutta nähtävissä oli kuitenkin selvät fuusiopartnereiden muodostamat proteiinijuovat, jonka mukaan katkeamistuotteena muodostui kahta proteiinifragmenttia.

Kocha *et al.* (1997) totesivat kupari(II)ionien ja vetyperoksidin aiheuttaneen albumiinin kokonaisvaltaisen hajoamisen 37 °C:ssa vuorokauden inkuboinnilla. Tässä esiteltävänä olevassa työssä tutkitussa fuusioproteiinin katkaisureaktiossa käytetyt inkubointiajat olivat kuitenkin huomattavasti lyhyempiä kuin Kocha *et al.* käyttämät, eikä 80 min pidempiä inkubointiaikoja tutkittu. On siis mahdollista että fuusioproteiinin täydellinen hajoaminen saavutettaisiin vuorokauden inkuboinnilla myös tässä reaktiossa etenkin ilman suolaa. Tämä on kuitenkin epätodennäköistä, sillä katkaisureaktion etenevyydessä ei havaittu eroa 60 min ja 80 min inkubointien välillä.

Allen ja Campbell (1996) ja Humphreys *et al.* (1999) raportoimat reaktiot poikkeavat täysin tämän työn kokeellisessa osassa tutkitusta reaktiosta. Allen ja Campbell ja Humphreys *et al.* tutkimat spesifiset kupari-ionin aikaansaamat pilkkoutumisreaktiot olivat hitaita ja vaativat yli 60 °C:een lämpötilan. On kuitenkin hyvin todennäköistä, että tämän työn kokeellisessa osassa käsitellyssä reaktiossa on kyseessä sama reaktio kuin, jonka Marx ja Chevion (1985)

kuvasivat. Marx ja Chevion olivat havainneet albumiinin pilkkoutuvan kupari-ionin ja askorbaatin vaikutuksesta viideksi eri fragmentiksi hapen läsnäollessa 37 °C:een lämpötilassa toistamalla askorbaatin lisäys ja 15 minuutin inkubointi useita kertoja peräkkäin. Hapen läsnäollessa askorbaatin hapettuessa muodostuu vetyperoksidia ja kyseessä voi olla sama reaktio, joka havaittiin tutkittaessa vetyperoksidin vaikutusta katkaisureaktioon näytteessä, jossa oli läsnä askorbaattia mutta ei vetyperoksidia. Tällöin havaittiin hidasta katkeamistuotteiden muodostumista, joka sopisi yhteen myös Marx ja Chevion tekemien havaintojen kanssa. Marx ja Chevion eivät tutkineet vetyperoksidin vaikutusta reaktioon.

Tämän työn kokeellisessa osassa tutkittu ilmiö on ollut tunnettu aiemmin, mutta sen spesifisyyttä ei ole aiemmin yritetty parantaa proteiinin muokkauksella. Nyt proteiinin spesifinen katkeaminen saavutettiin fuusioproteiiniin suunnitellusta erityisestä katkaisukohdasta. Kupari-ionien aiheuttama degradaatio pystyttiin ohjaamaan haluttuun kohtaan proteiinia histidiinijakson avulla.

Kokeellisessa osassa tutkitun vapaalla kupari(II)ionilla tapahtuvan fuusioproteiini katkeamisreaktion mekanismia ei tiedetä. On mahdollista että kyseessä on Fenton reaktion aikaansaama hydroksyyli-radikaalien muodostuminen ja näiden aiheuttama proteiinin pilkkoutuminen. Kupari-ionien tiedetään sitoutuvan histidiinitähteisiin, jolloin hydroksyyli-radikaalien muodostuminen peptidilinkkerin histidiiniosaan sitoutuneiden kupari-ionien läheisyydessä voisi aikaansaada peptidilinkkerin spesifisen pilkkoutumisen histidiinialueelta. Tällöin olisi myös oletettavaa, että katkeamisessa esiintyisi lievää heterogeeniaa, kuten C-terminaalisen katkeamistuotteen N-terminaalisen sekvensoinnin epäonnistuminen osoitti. Myös Chiou, Kocha *et al.* sekä Max ja Chevion epäilivät havaitsemiensa proteiinien pilkkoutumisen olevan seurausta Fentonkemian aikaansaamista hydroksyyli-radikaaleista.

Miksi sitten tällaisia samanlaisia kupari-ionin aiheuttamia proteiineja tuhoavia reaktioita ei tapahtuisi *in vivo* ihmisissä, eläimissä tai mikro-organismeissa? Kuten

luvuissa 4.2 ja 4.3.3 kerrottua, nisäkkäillä on olemassa useita entsyymejä, jotka osallistuvat vapaan kuparin sitomiseen radikaalien muodostumisen ehkäisemiseksi sekä jo syntyneiden radikaalien torjuntaan ja poistamiseen. Vapaan kuparin pitoisuus soluissa on käytännössä nolla, jolloin hydroksyyli-radikaalien muodostumisen mahdollisuus on minimoitu. Lisäksi C-vitamiini on vesiliukoinen vitamiini, joka ei kerry elimistöön. Nisäkkäiden elimistö ei kykene itse valmistamaan C-vitamiinia ja vain tarvittava määrä tätä vitamiinia imeytyy ravinnosta elimistöön ehkä juuri askorbaatin potentiaalisen haitallisuuden vuoksi.

Useita bioteknisesti merkittäviä proteiineja tuotetaan fuusioproteiineina, jolloin voidaan esimerkiksi parantaa proteiinin liukoisuutta solun sisällä sekä helpottaa proteiinin puhdistusta ja detektiota. Fuusioparina käytetty proteiini voi häiritä halutun proteiinin toimintaa tai olla immunogeeninen, joten fuusiopari halutaan yleensä poistaa. Fuusioproteiineja voidaan katkaista halutusta kohdasta kemiallisilla reagensseilla tai entsymaattisesti erilaisilla proteaaseilla. Kemialliset reagenssit vaativat kuitenkin proteiineille epäsuotuisat tai jopa tuhoiset olosuhteet ja proteaasien käyttö on kallista ja vaatii ylimääräisen puhdistusvaiheen proteolyttisen entsyymin poistamiseksi tuotteesta.

Metalli-ionien käyttö fuusioproteiinien katkaisussa olisi teollisuuden näkökulmasta lupaava menetelmä. Tutkitun kaltainen kupari-ioneilla tapahtuva fuusioproteiinien katkaisu olisi helppo ja nopea toteuttaa. Etuja proteaasien käyttöön nähden olisivat reagenssien helppo saatavuus sekä ylivoimaisesti edullisin hinta. Lisäksi katkaisureaktion pysäytys metalli-ionit kelatoivalla yhdisteellä on nopea ja erittäin tehokas. Toinen mahdollinen sovellus kupari-ioneilla tapahtuvalle proteiinien spesifiselle katkaisulle on proteiinien kohdennettu inaktivaatio. Katkaisureaktio ei ollut aivan ennustettava, mikä kertoo siitä ettei reaktion tarkkaa toimintaperiaatetta tiedetä. Tämä heikentää menetelmän hyödynnettävyyttä eri sovelluksissa. Jotta menetelmää voitaisiin käyttää työkaluna biotekniikassa, menetelmää tulisi parantaa, etenkin liittyen saantoon. Reaktio-olosuhteita tulisi myös mahdollisesti optimoida jokaisen käytetyn proteiinin kohdalla erikseen.

9 YHTEENVETO

Fuusioproteiini pilkkoutui kahteen fuusiopartnereiden kokoa vastaaviin fragmentteihin kupari(II)ionin vaikutuksesta askorbaatin ja vetyperoksidin läsnäollessa. Reaktio-olosuhteiden vaikutusta fuusioproteiinin katkaisureaktion tutkittiin. Katkaisureaktion spesifisyyttä ja tehokkuutta pystyttiin parantamaan vaihtelemalla pH:ta, puskuria, reaktioaikaa, reaktiolämpötilaa ja suola-, kupari(II)ioni-, ja vetyperoksidikonsentraatiota.

Katkaisureaktion todettiin olevan nopea ja katkeamistuotteita havaittiin jo 3 min inkuboinnin jälkeen. Paras katkeamistulos saavutettiin 60 min reaktioajalla. Pidemmällä reaktioajoilla ei ollut vaikutusta katkeamistulokseen. Korkealla reaktiolämpötilalla oli reaktiota kiihdyttävä vaikutus, mutta fuusioproteiinin katkeaminen oli myös runsasta 0 °C:ssa. Paras katkeamistulos saavutettiin lämpötilassa 30 °C. Reaktioliuoksen suolapitoisuus paransi olennaisesti reaktion spesifisyyttä. Katkaisureaktion todettiin toimivan hyvin pH-alueella 5-8. Askorbaatin läsnäolo oli välttämätön katkaisureaktion toimivuudelle, mutta askorbaatin pitoisuudella ei ollut merkitystä. Vetyperoksidipitoisuus sen sijaan oli merkittävä katkaisureaktiossa. Katkeamistuotteiden muodostumista oli havaittavissa myös ilman vetyperoksidin lisäystä. Tämä johtui todennäköisesti vetyperoksidin muodostumisesta askorbaatin hapettuessa kupari(II)ionien vaikutuksesta. Myös kupari(II)ionipitoisuus vaikutti katkaisureaktion tehokkuuteen. Paras katkeamistulos saavutettiin 10 ekvivalentilla kuparia proteiiniin nähden. Tätä suuremmilla pitoisuuksilla saavutettiin huonompi katkeamistulos johtuen todennäköisesti kupari(II)ionien katkaisureaktion kulkua haittaavista vuorovaikutuksista fuusioproteiinin kanssa.

Katkaisureaktion tarkan katkeamiskohdan selvittämiseksi katkeamistuotteet erotettiin kromatografisesti ja niiden N-terminaalinen sekvenssi sekä molekyylipaino määritettiin. Fuusioproteiinin N-terminaalisen katkeamistuotteen sekä katkeamattoman fuusioproteiinin N-terminukset olivat vahingoittumattomat.

C-terminaalisen katkeamistuotteen N-terminaalista sekvenssiä ei yrityksistä huolimatta saatu selville, johtuen todennäköisesti Edman degradaation kannalta välttämättömän vapaan aminoryhmän puuttumisesta tai heterogeenisestä N-terminuksesta.

MBP-H6-SSO2 -fuusioproteiinin katkeamistuotteille saatiin MALDI-TOF massaspektrometrillä keskimääräiset massat 41,9 ja 31,2 kDa ja katkeamattomalle fuusioproteiinille 73,2 kDa, joka on sama kuin katkeamistuotteiden yhteenlaskettu massa virherajat huomioon ottaen. Verrattaessa saadun MBP-fragmentin massaa fuusioproteiinin tunnettuun sekvenssiin, ja kun fragmentin N-terminuksen tiedettiin sekvensoinnin perusteella olevan intakti, todettiin fuusioproteiinin katkeamisen tapahtuneen peptidilinkkerin histidiinialueelta.

N-terminaalisen sekvenssin sekä molekyylipainon määrityksissä katkeamattoman MBP-H6-SSO2 -fuusioproteiinin sekä C-terminaalisen katkeamistuotteen todettiin olleen n. 1 kDa oletettua lyhyemmät. Määritettäessä puhtaan fuusioproteiinin massa, todettiin sen olevan luultua pienempi ja virhe fuusioproteiinigeenissä tai proteiinien katkeaminen läheltä C-terminusta fuusioproteiinin tuotossa osoittautui mahdolliseksi. Katkaisureaktion saanto oli heikko eikä sitä olosuhteiden parantelusta huolimatta pystytty olennaisesti parantamaan. Fuusioproteiinin sisältämästä MBP:sta saatiin katkaisureaktiolla ja sen jälkeisellä geelisuodatuksella erotettua ja puhdistettua 31 %.

Kokeellisessa osassa tutkittu ilmiö on ollut tunnettu jo aiemmin, mutta sen spesifisyyttä ei ole aiemmin yritetty parantaa proteiinin muokkauksella. Nyt proteiinin spesifinen katkeaminen saavutettiin fuusioproteiiniin suunnitellusta erityisestä katkaisukohdasta. Kupari-ionien aiheuttama degradaatio pystyttiin ohjaamaan haluttuun kohtaan proteiinia histidiinijakson avulla. Jotta menetelmää voitaisiin käyttää työkaluna fuusioproteiinien katkaisussa tai proteiinien kohdennetussa inaktivaatiossa, menetelmää tulisi edelleen parantaa, etenkin liittyen saantoon. Reaktio-olosuhteita tulisi myös mahdollisesti optimoida jokaisen proteiinin kohdalla erikseen.

10 JATKOTUTKIMUSEHDOTUKSET

Katkeamattoman fuusioproteiinin mahdollista inaktiivisuutta olisi syytä tutkia. Jokaisessa katkaisureaktiossa osa fuusioproteiinista ei katkennut ja tähän voisi olla syynä fuusioproteiinin osittainen inaktiivisuus tai katkaisukohdan saavuttamattomuus johtuen esimerkiksi muodostuneiden proteiinifragmenttien läsnäolosta. Tätä voitaisiin tutkia erottamalla katkaisureaktiossa katkeamaton fuusioproteiini esimerkiksi geelisuodatuksella, poistamalla tästä suolat suolanpoistolla, konsentroimalla proteiini jälleen tunnettuun pitoisuuteen ja toistamalla katkaisureaktio.

Tutkitun fuusioproteiinin vapaalla kupari(II)ionilla tapahtuvan katkaisureaktion reaktiomekanismia voitaisiin tutkia. Radikaalien osallistumista reaktioon voitaisiin tutkia käyttämällä radikaalipuhdistajia, kuten mannitolia ja superoksididismutaasia. Mikäli katkeaminen pystyttäisiin estämään esimerkiksi mannitolin lisäyksellä, voitaisiin hydroksyyli-radikaalien osallistuminen katkaisureaktioon osoittaa. Superoksididismutaasin katkaisureaktiota ehkäisevä vaikutus olisi osoitus superoksidiradikaalien osallistumisesta katkaisureaktioon. Tutkimalla hapen kulutusta esimerkiksi O_2 -elektrodilla tai esimerkiksi peittämällä reaktioliuoksen pinta parafiinillä, saataisiin myös tietoa katkaisun reaktiomekanismista. Mikäli katkaisureaktio tarvitsee toimiakseen happea, voisi se merkitä mm. askorbaatin hapettumisen tarvetta katkaisureaktion toimimiseksi. Reaktioliuoksen absorbanssin kehitystä inkuboinnin aikana voitaisiin myös tutkia, koska askorbaatin hapettuessa dehydroaskorbaatiksi sen absorbanssi muuttuu ja muutoksen havaitseminen ja muutoksen laajuus osoittaisi myös askorbaatin hapettumisen esiintymistä osana reaktiomekanismia.

Katkaisureaktiossa saatujen proteiinifragmenttien toiminnallisuutta olisi myös hyvä tutkia. Mikäli katkaisureaktiossa syntyneet proteiinifragmentit eivät säily toiminnallisina, heikentää se katkaisumenetelmän käyttömahdollisuuksia työkaluna fuusioproteiinien katkaisussa. Proteiinifragmenttien toiminnallisuutta

voitaisiin selvittää tutkimalla katkaisutuotteiden affiniteettia vastaaviin affiniteettimatriiseihin, kuten esimerkiksi streptavidiinin sitoutumista immobilisoituun biotiiniin ja MBP:n sitoutumista immobilisoituun amyloosiin.

Pelkän streptavidiini, SSO2:n sekä MBP:n kestävyys kupari-ioni käsittelyä vastaan olisi hyvä testata. Kromatografisilla menetelmillä saatiin MBP-Hx-AVI - fuusioproteiinista erotettua pelkkä MBP-fragmentti sekä reagoimaton fuusioproteiini, mutta streptavidiniä, josta olisi katkennut kaikki neljä MBP:a, ei onnistuttu erottamaan. Tämä voisi selittyä streptavidiinin herkkyydellä kupari-ionien läsnäolosta syntyneille radikaaleille, jotka mahdollisesti pilkkoisivat proteiinin, eikä sitä näin ollen saataisi erotettua. Erotettaessa MBP-Hx-SSO2 - fuusioproteiinin katkeamistuotteita geelisuodatuksella, huomattiin että aallonpituudella 280 nm saatu SSO2-piikki oli huomattavasti pienempi, kuin vastaava MBP-piikki. SSO2- ja MBP-proteiineja on fuusioproteiinissa 1:1, jolloin katkeamistuotteena saatavien proteiinien pitoisuudet pitäisi olla yhtä suuret. Tämä voisi myös selittyä sillä, että SSO2 olisi MBP:a herkempi radikaaleille ja pilkkoutuisi osittain.

11 KIRJALLISUUSLUETTELO

Adman, E.T., Copper protein structures. Teoksessa *Advances in Protein Chemistry, Volume 42, Metalloproteins: Structural Aspects*, toim. Anfinsen, C.B., Edsall, J.T., Richards, F.M. ja Eisenberg, D.S., Academic Press, USA 1991, ss.145–197.

Allen, G. ja Campbell R.O., Specific cleavage of histidine-containing peptides by copper (II), *Int. J. Peptide Protein Res.* **48** (1996) 265–273.

Anon., Enterokinase,

http://calzyme.com/commerce/catalog/spcategory.jsp?category_id=1049,

1.11.2004a.

Anon., Kahden samanlaisen hiivan proteiinien eritystä tehostavan proteiinin erityisfunktiot, http://www.vtt.fi/bel/tuloksia/kahden_samankaltaisen_hiivan.htm,

17.12.2004b.

Anon., Properties and reactions of amino acids,

<http://brc.se.fju.edu.tw/plans/slides/030516/properties.pdf>, 13.10.2004c.

Antorini, M., Breme, U., Caccia, P., Grassi, C., Lebrun, S., Orsini, G., Taylor, G., Valsasina, B., Marengo, E., Todeschini, R., Andersson, C., Gellerfors, P. ja Gustafsson, J.-G., Hydroxylamine-Induced Cleavage of the Asparaginy-Glycine Motif in the Production of Recombinant Proteins: The Case of Insulin-like Growth Factor I, *Prot. Exp. Purif.* **11** (1997) 135–147.

Armstrong, F.B., *Biochemistry*, 3. painos, Oxford University Press, USA 1989, ss. 529–531.

Bartnikas, T.B. ja Gitlin J.D., Mechanisms of Biosynthesis of Mammalian Copper/Zinc Superoxide Dismutase, *J. Biol. Chem.* **278** (2003) 33602–33608.

Bayer, E.A., Ben-Hur, H. ja Wilchek, M., Isolation and Properties of Streptavidin, *Methods Enzymol.* **184** (1990) 80-89.

Bommarius, A.S. ja Riebel, B.R., *Biocatalysis*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Darmstadt 2004, 85-90.

Bornstein, P. ja Balian, G., Cleavage at Asn-Gly Bonds with Hydroxylamine, *Methods Enzymol.* **47** (1977) 132-147.

Brown, T.A., *Gene Cloning and DNA Analysis, An Introduction*, 4. painos, Blackwell Science Ltd., UK 2001, ss. 293–298.

Bugg, T., *Introduction to enzyme and Coenzyme Chemistry*, 2. painos, Blackwell Publishing, Gosport 2004, ss. 82-98, 147–148.

Chiou, S.-H., Chang, W.-C., Jou, Y.-S., Chung, H.-M.M. ja Lo, T.B., Specific Cleavages of DNA by Ascorbate in the Presence of Copper Ion or Copper Chelates, *J. Biochem.* **98** (1985) 1723–1726.

Chiou, S.H., DNA- and Protein-Scission Activities of Ascorbate in the Presence of Copper Ion and a Copper-Peptide Complex, *J. Biochem.* **94** (1983) 1259-1267.

Chiou, S.-H., DNA-Scission Activities of Ascorbate in the Presence of Metal Chelates, *J. Biochem.* **96** (1984) 1307–1310.

Chong, S., Mersha, F.B., Comb, D.G., Scott, M.E., Landry, D., Vence, L.M., Perler, F.B., Benner, J., Kucera, R.B., Hirvonen, C.A., Pelletier, J.J., Paulus, H. ja Xu, M.-Q., Single-column purification of free recombinant proteins using a self-cleavable affinity tag derived from a protein splicing element, *Gene* **192** (1997) 271–281.

Cutler, R.G., Antioxidants, aging and longevity. Teoksessa *Free Radicals in biology*, volume VI, toim. Pryor, W.A., Academic Press, Lontoo 1984, ss. 371–428

Dervan, P.B., Design of Sequence-Specific DNA-Binding Molecules, *Science* **232** (1986) 464–471.

Dugas, H., *Bioorganic Chemistry, A Chemical Approach to Enzyme Action*, 3. painos, Springer, USA 1999, ss. 388–481.

Ermácora, M.R., Delfino, J.M., Cuenoud, B., Schepartz, A. ja Fox, R.O., Conformation-dependent cleavage of staphylococcal nuclease with a disulphide-linked iron chelate, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89** (1992) 6383–6387.

Fabian, H., Copper. Teoksessa *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, vol. A7, 5. painos, toim. Gerhartz, W., Yamamoto, Y.S., Campbell, F.T., Pfeifferkorn, R. ja Rounsaville, J.F., VCH Verlagsgesellschaft, Saksa 1986, ss.471–593.

Frieden, E., The biochemistry of copper, *Scientific American* **218** (1968) 103–114.

Green, M.J. ja Hill, H.A.O, Chemistry of dioxygen, *Methods Enzymol.* **105** (1984) 3–22.

Gross, E., The Cyanogen Bromide Reaction, *Methods Enzymol.* **11** (1967) 238–255.

Hosfield, T. ja Lu, Q., Influence of the Amino Acid Residue Downstream of (Asp)₄Lys on Enterokinase Cleavage of a Fusion Protein, *Anal. Biochem.* **269** (1999) 10–16.

Hoyer, D., Cho, H. ja Schultz P.G., A New Strategy for Selective Protein Cleavage, *J. Am. Chem. Soc.* **112** (1990) 3249–3250.

Humphreys, D.P., King, L.M., West, S.M., Chapman, A.P., Sehdev, M., Redden, M.W., Glover, D.J., Smith, B.J. ja Stephens, P.E., Improved efficiency of site-specific copper (II) ion-catalysed protein cleavage effected by mutagenesis of cleavage site, *Protein Eng.* **13** (2000) 201–206.

Humphreys, D.P., Smith, B.J., King, L.M., West, S.M., Reeks, D.G. ja Stephens, P.E., Efficient site specific removal of a C-terminal FLAG fusion from a Fab' using copper (II) ion catalysed protein cleavage, *Protein Eng.* **12** (1999) 179–184.

Jenny, R.J., Mann, K.G. ja Lundblad R.L., A critical review of the methods for cleavage of fusion proteins with thrombin and factor Xa, *Prot. Expr. Purif.* **31** (2003) 1–11.

Kelley R.F. ja Winkler M.E., Folding of eykariotic proteins produces in *Escherichia coli*. Teoksessa *Genetic Engineering, Principles and Methods*, Osa 12, toim. Setlow, J.K, Plenum Press, New York 1990, ss. 4–5.

Kim, K., Rhee, S.G. ja Stadtman, E.R., Nonenzymatic Cleavage of Proteins by Reactive Oxygen Species Generated by Dithiothreitol and Iron, *J. Biol. Chem.* **260** (1985) 15394–15397.

Kocha, T., Yamaguchi, M., Ohtaki, H., Fukuda, T. ja Aoyagi, T., Hydrogen peroxide-mediated degradation of protein: different oxidation modes of copper- and iron-dependent hydroxyl radicals on the degradation of albumin, *Biochimica Biophysica Acta* **1337** (1997) 319–326.

LaVaille, E.R. ja McCoy, J.M., Gene fusion expression systems in *Escherichia coli*, *Curr. Opin. Biotech.* **6** (1995) 501–506.

LaVaille, E.R., McCoy, J.M. ja Riggs, P., Introduction to Expression by Fusion Protein Vectors. Teoksessa *Current Protocols in Molecular Biology*, toim. Ausubel F.M., John Wiley & Sons, USA 1994a, ss. 16.4.1–16.4.4.

LaVaille, E.R., McCoy, J.M., Smith, D.B. ja Riggs, P., Enzymatic and Chemical Cleavage of Fusion Proteins. Teoksessa *Current Protocols in Molecular Biology*, toim. Ausubel F.M., John Wiley & Sons, USA 1994b, ss. 16.4.5–16.4.17.

Lien, S., Milner, S.J., Graham, L.D, Wallace, J.C. ja Francis, G.L., Linkers for Improved Cleavage of Fusion Proteins with an Engineered α -Lytic Protease, *Biotechn. Bioeng.* **74** (2001) 335–343.

Lindbladh, C., *Genetically prepared fusion proteins, Applications in analysis and in the study of organized enzyme systems*, Väitöskirja, University of Lund, Department of Pure and Applied Biochemistry, Lund 1992, 66 s.

Linder, M.C. ja Hazegh-Azam, M., Copper biochemistry and molecular biology, *Am. J. Clin. Nutr.* **63** (1996) 797S–811S.

Linder, M.C., Copper and genomic stability in mammals, *Mutation Res.* **475** (2001) 141–152.

Lottspeich, F. ja Zorbas, H., *Bioanalytik, a Textbook*, Spektrum Akademischer Verlag, 1998. Ref. Bommarius, A.S. ja Riebel, B.R., *Biocatalysis*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Darmstadt 2004, 85–90.

Madigan, M.T., Martinko, J.M. ja Parker, J., *Brock Biology of Microorganisms*, 10. painos, Pearson Education Inc., USA 2003, ss. 1007–1009.

Maier, T. ja Jessen, L., TEV Nla protease as a tool for *in vitro* and *in vivo* proteolysis, <http://www.cf.ac.uk/biosi/staff/ehrmann/tools/TEVprot.html>, 13.10.2004.

Marx, G. ja Chevion, M., Site-specific modification of albumin by free radicals, *Biochem. J.* **236** (1985) 397–400.

Milović, N.M. ja Kostić, N.M., Palladium(II) Complex as a Sequence-Specific Peptidase: Hydrolytic Cleavage under Mild Conditions of X-Pro Peptide Bonds in X-Pro-Met and X-Pro-His Segments, *J.Am.Chem.Soc.* **125** (2003) 781–788.

Nagai, K. ja Thøgersen, H.C., Generation of β -globin by sequence-specific proteolysis of a hybrid protein produced in *Escherichia coli*, *Nature* **309** (1984) 810–812.

Nilsson, J., Ståhl, S., Lundeberg, J., Uhlén M. ja Nygren, P.Å., Affinity Fusion Strategies for Detection, Purification and Immobilization of Recombinant Proteins, *Prot. Exp. Purif.* **11** (1997) 1–16.

Nygren, P-Å., Ståhl, S. ja Uhlén, M., Engineering proteins to facilitate bioprocessing, *Trends Biotech.* **12** (1994) 184–188.

Park, H.-B., Pyo, S.-H., Hong, S.-S. ja Kim, J.-H., Optimization of the hydroxylamine cleavage of an expressed fusion protein to produce a recombinant antimicrobial peptide, *Biotech. Lett.* **23** (2001) 637–641.

Park, S.J., Ryu, K., Suh, C.W., Chai, Y.G., Kwon, O.B., Park, S.K. ja Lee, E.K., Solid-phase refolding of poly-lysine fusion protein of hEGF and angiogenin, *Biotech. Bioproc. Eng.* **7** (2002) 1–5.

Parks, T.D., Leuther, K.K., Howard, E.D., Johnston, S.A. ja Dougherty, W.G., Release of Proteins and Peptides from Fusion Proteins Using a Recombinant Plant Virus Proteinase, *Anal. Biochem.* **216** (1994) 413–417.

Pelletier, O., Vitamin C (L-Ascorbic and Dehydro-L-Ascorbic Acids). Teoksessa *Methods of vitamin assay*, toim. Augustin, J., Klein, B.P., Becker, D. ja Venugopal, P.B., 4.painos, John Wiley & Sons, USA 1985, ss.303–347.

Perler, F.B., Xu, M.-Q. ja Paulus, H., Protein slicing and autoproteolysis mechanisms, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1** (1997) 292–299.

Platis, I.E., Ermácora, M.R. ja Fox, R.O., Oxidative Polypeptide Cleavage Mediated by EDTA-Fe Covalently Linked to Cysteine Residues, *Biochemistry* **32** (1993) 12761–12767.

Poland, B.W., Xu M.-Q. ja Quijcho, F.A., Structural Insights into the Protein Splicing Mechanism of PI-SceI, *J. Biol. Chem.* **275** (2000) 16408–16413.

Rae, T.D., Schmidt, P.J., Pufahl, R.A., Culotta, V.C. ja O'Halloran, T.V., Undetectable Intracellular Free Copper: The Requirement of a Copper Chaperone for Superoxide Dismutase, *Science* **284** (1999) 805–808.

Rana, T.M. ja Meares, C.F., Iron Chelate Mediated Proteolysis: Protein Structure Dependence, *J. Am. Chem. Soc.* **113** (1991a) 1859–1861.

Rana, T.M. ja Meares, C.F., Specific Cleavage of a Protein by an Attached Iron Chelate, *J. Am. Chem. Soc.* **112** (1990) 2457–2458.

Rana, T.M. ja Meares, C.F., Transfer of oxygen from an artificial protease to peptide carbon during proteolysis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88** (1991b) 10578–10582.

Roe, S., Separation based on structure. Teoksessa *Protein Purification methods, A practical approach*, toim. Harris, E.L.V. ja Angal, S., Oxford University Press, Oxford 1989, ss. 200–221

Sambrook, J. ja Russell, D.W., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 3. painos, Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA 2001, ss. 15.4–15.8, 15.36–15.43, 15.61–15.65.

Schepartz A. ja Cuenoud B., Site-Specific Cleavage of the Protein Calmodulin Using a Trifluoroperazine-Based Affinity Reagent, *J. Am. Chem. Soc.* **112** (1990) 3247–3249.

Stryer, L., *Biochemistry*, 4. painos, W.H. Freeman and Company, New York 2000, ss. 45–72, 529–558.

Suominen, I., Solujen rakenne ja toiminta. Teoksessa *Bioprosessitekniikka*, toim. Leisola, M. ja von Weymarn, N., 1. painos, WSOY, Porvoo 2002, ss. 48–51.

Tainer, J.A., Getzoff, E.D., Richardson, J.S. ja Richardson, D.C., Structure and mechanism of copper, zinc superoxide dismutase, *Nature* **306** (1983) 284–287.

Waugh, D.S., TEV protease FAQ, http://mcl1.ncifcrf.gov/waugh_tech/faq/tev.pdf, 31.10.2004.

Villa, S., De Fazio, G. ja Canosi U., Cyanogen Bromide Cleavage at Methionine Residues of Polypeptides Containing Disulfide Bonds, *Anal. Biochem.* **177** (1989) 161–164.

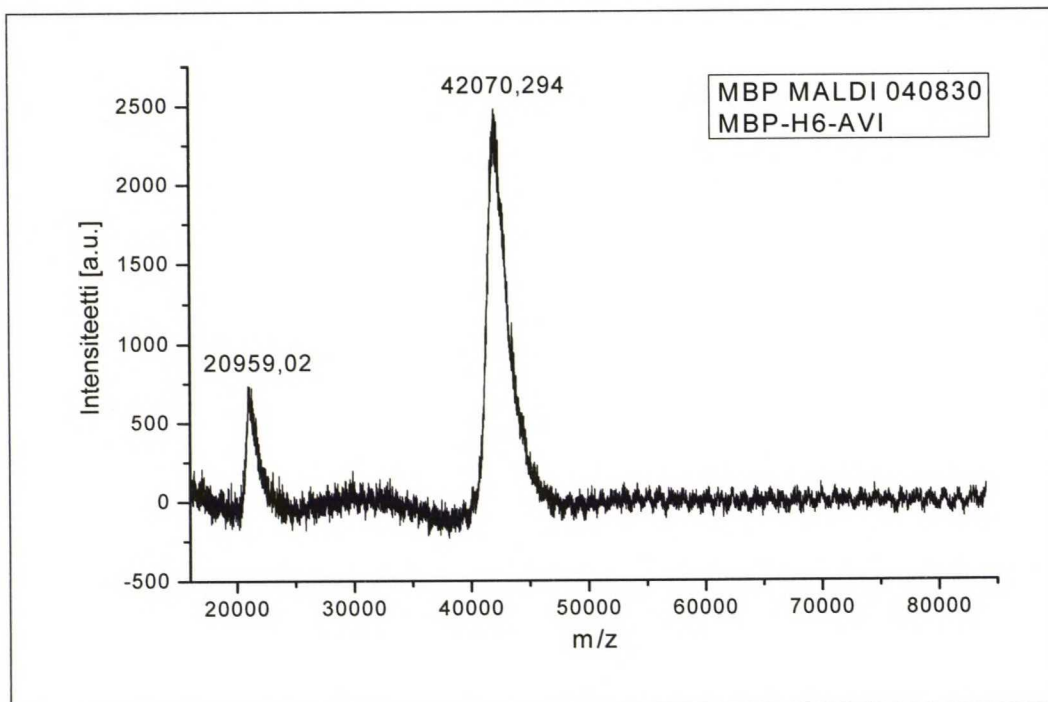
von Weymarn, N. Valmistusprosessit. Teoksessa *Bioprosessitekniikka*, toim. Leisola, M. ja von Weymarn, N., 1. painos, WSOY, Porvoo 2002, ss. 192–196.

MBP-H_x-AVI

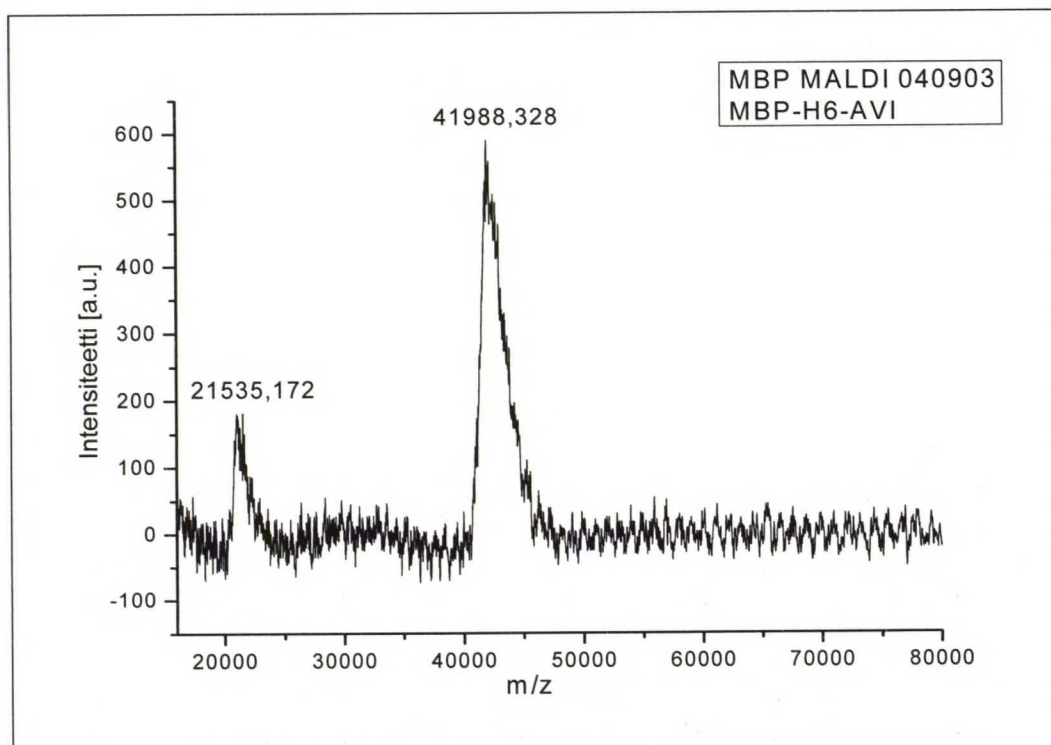
MKIEEGKLVI	WINGDKGYNG	LAEVGKKFEK	DTGIKVTVEH	PDKLEEKFPQ
VAATGDGPDI	IFWAHDRFGG	YAQSGLLAEI	TPDKAFQDKL	YPFTWDAVRY
NGKLIAYPIA	VEALSLIYNK	DLLPNPPKTW	EEIPALDKEL	KAKGKSALMF
NLQEPYFTWP	LIAADGGYAF	KYENGKYDIK	DVGVDNAGAK	AGLTFLVDLI
KNKHMNADTD	YSIAEAAFNK	GETAMTINGP	WAWSNIDTSK	VNYGVTVLPT
FKGQPSKPFV	GVLSAGINAA	SPNKELAKEF	LENYLLTDEG	LEAVNKDKPL
GAVALKSYEE	ELAKDPRIAA	TMENAQKGEI	MPNIPQMSAF	WYAVRTAVIN
AASGRQTVDE	ALKDAQTNSS	<u>SGSPTGASTH</u> _x	<u>GSPTGASTE</u> F	DPSKDSKAQV
SAAEAGITGT	WYNQLGSTFI	VTAGADGALT	GTYESAVGNA	ESRYVLTGRY
DSAPATDGSG	TALGWTVAWK	NNYRNAHSAT	TWSGQYVGGA	EARINTQWLL
TSGTTEANAW	KSTLVGHDTF	TKVKPSAASI	DAACKAGVNN	GNPLDAVQQ

MBP-H6-SSO2

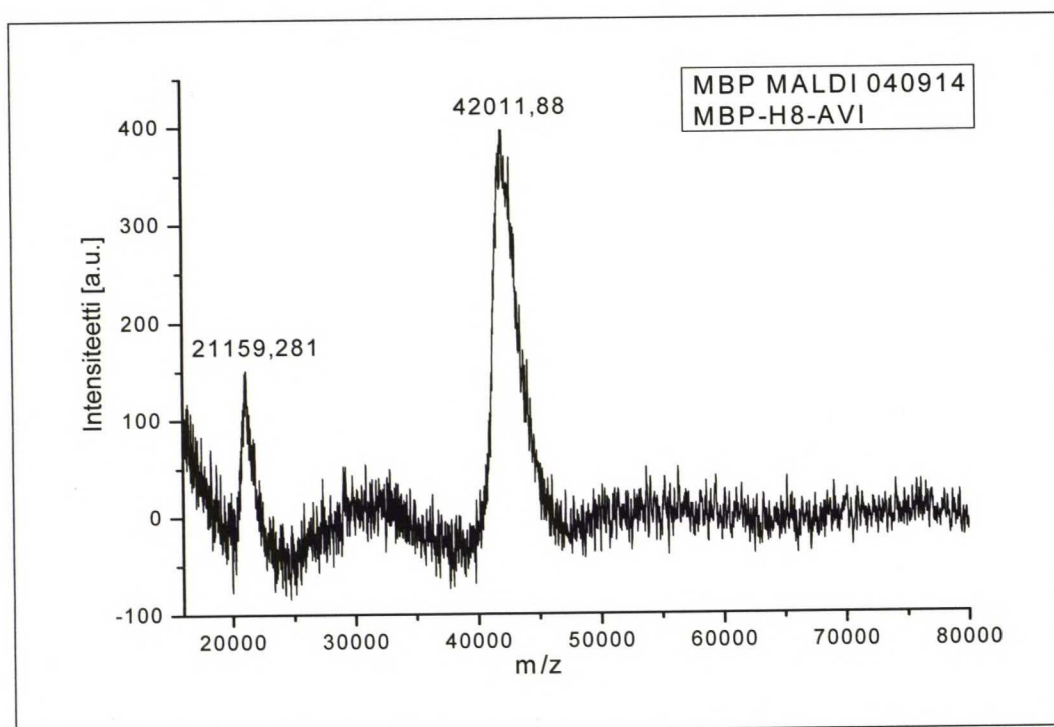
MKIEEGKLVI	WINGDKGYNG	LAEVGKKFEK	DTGIKVTVEH	PDKLEEKFPQ
VAATGDGPDI	IFWAHDRFGG	YAQSGLLAEI	TPDKAFQDKL	YPFTWDAVRY
NGKLIAYPIA	VEALSLIYNK	DLLPNPPKTW	EEIPALDKEL	KAKGKSALMF
NLQEPYFTWP	LIAADGGYAF	KYENGKYDIK	DVGVDNAGAK	AGLTFLVDLI
KNKHMNADTD	YSIAEAAFNK	GETAMTINGP	WAWSNIDTSK	VNYGVTVLPT
FKGQPSKPFV	GVLSAGINAA	SPNKELAKEF	LENYLLTDEG	LEAVNKDKPL
GAVALKSYEE	ELAKDPRIAA	TMENAQKGEI	MPNIPQMSAF	WYAVRTAVIN
AASGRQTVDE	ALKDAQTNSS	<u>SGSPTGASTH</u>	<u>HHHHHGSPTG</u>	<u>ASTEFMSNAN</u>
PYENNNPYAE	NYEMQEDLNN	APTGHSDGSD	DFVAFMNKIN	SINANLSRYE
NIINQIDAQH	KDLLTQVSEE	QEMELRRSLD	DYISQATDLQ	YQLKADIKDA
QRDGLHDSNK	QAQAENCRQK	FLKLIQDYRI	IDSNYKEESK	EQAKRQYTII
QPEATDEEVE	AAINDVNGQQ	IFSQALLNAN	RRGEAKTALA	EVQARHQELL
KLEKTMAELT	QLFNDMEELV	IEQQENVDDVI	DKNVEDAQQD	VEQGVGHTNK
AVKSARKARK	NKIR			



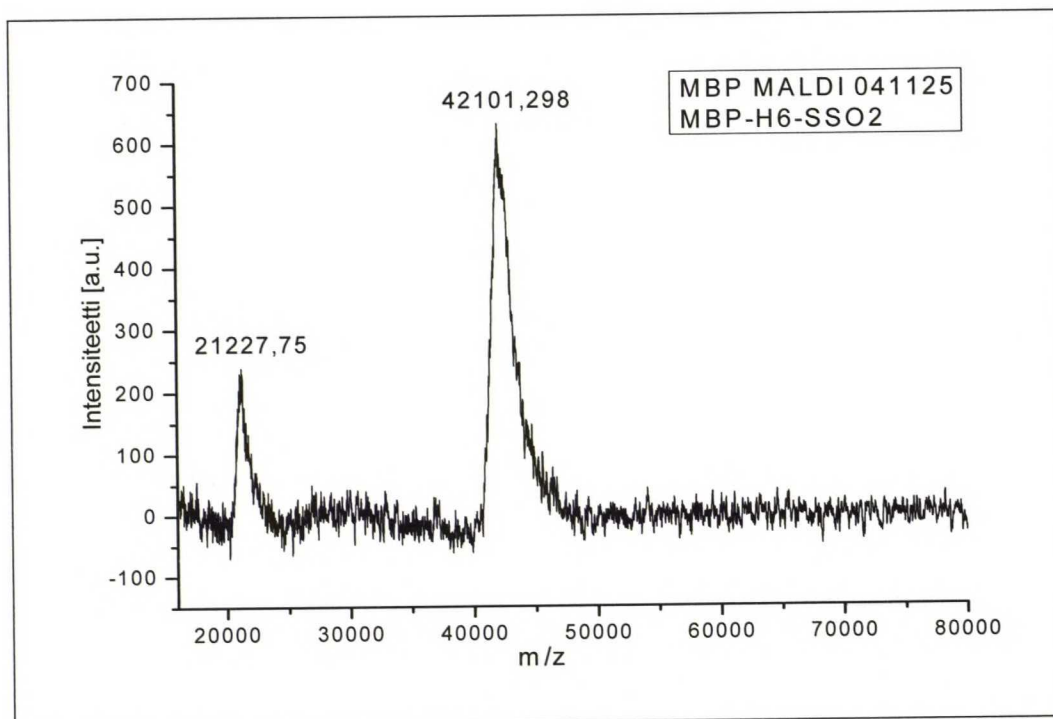
Kuvaaja 1. Vapaalla kupari(II)ionilla tehdyn MBP-H6-AVI -fuusioproteiinin katkaisureaktion MBP-katkaisutuotteen MALDI-TOF MS -molekyylipainokuvaaja.



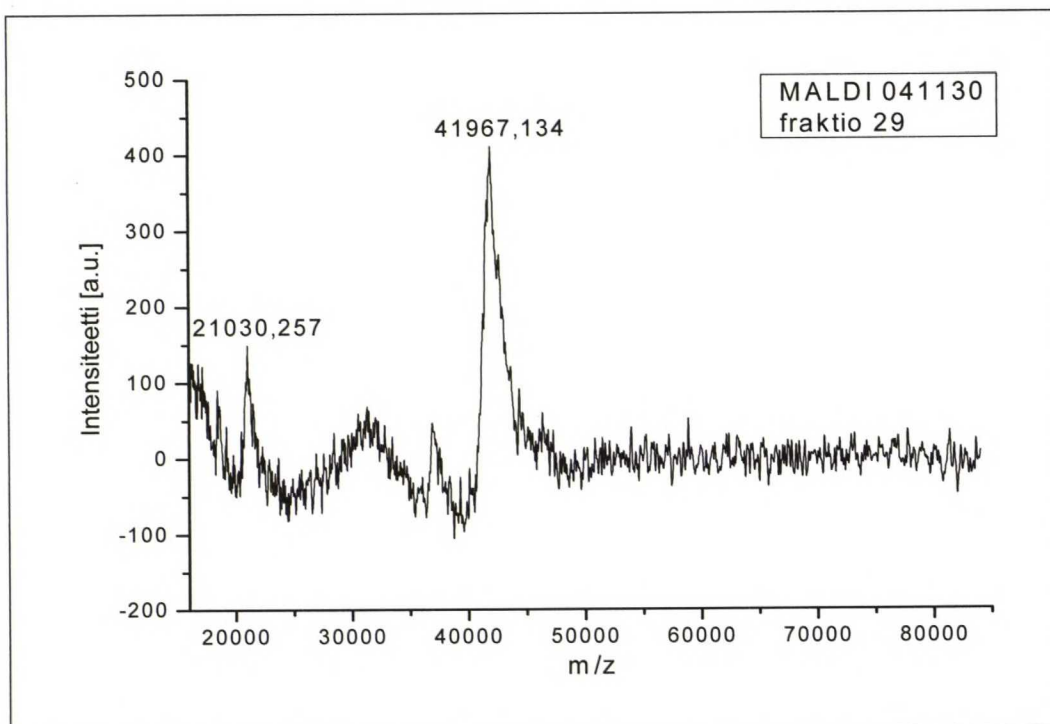
Kuvaaja 2. Vapaalla kupari(II)ionilla tehdyn MBP-H6-AVI -fuusioproteiinin katkaisureaktion MBP-katkaisutuotteen MALDI-TOF MS -molekyylipainokuvaaja.



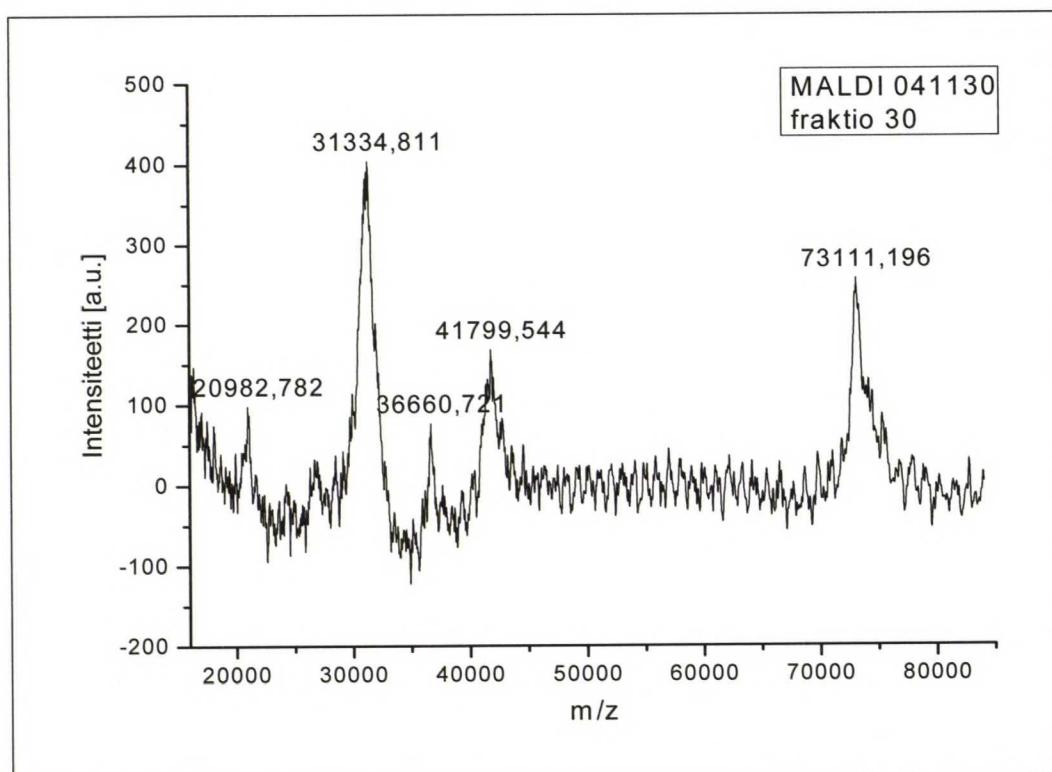
Kuvaaja 3. Vapaalla kupari(II)ionilla tehdyn MBP-H8-AVI -fuusioproteiinin katkaisureaktion MBP-katkaisutuotteen MALDI-TOF MS -molekyylipainokuvaaja.



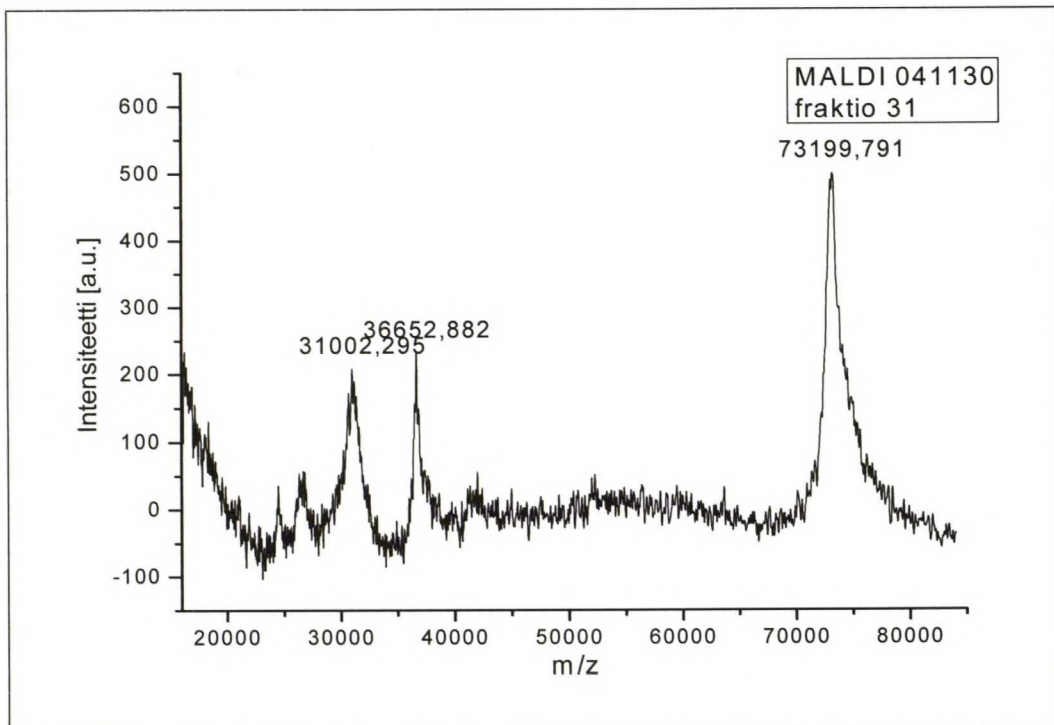
Kuvaaja 4. Vapaalla kupari(II)ionilla tehdyn MBP-H6-SSO2 -fuusioproteiinin katkaisureaktion MBP-katkaisutuotteen MALDI-TOF MS -molekyylipainokuvaaja.



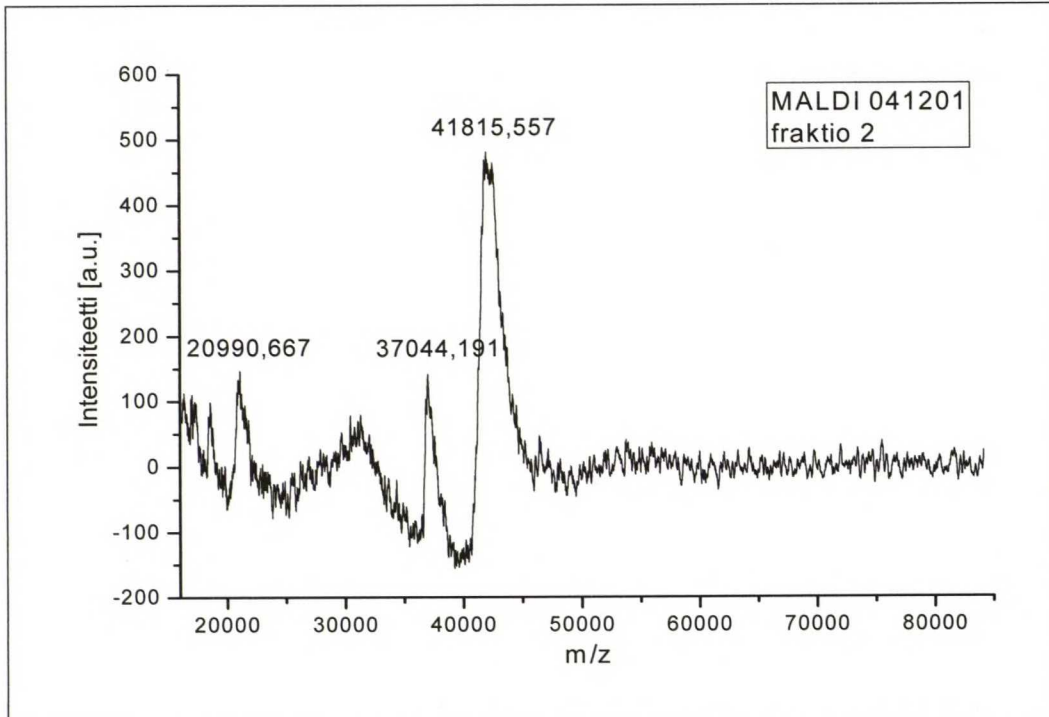
Kuvaaja 1. Vapaalla kupari(II)ionilla tehdyn MBP-H6-SSO₂ -fuusioproteiinin katkaisureaktion käänteisfaasikromatografialla puhdistetun reaktioliuoksen fraktion 29 MALDI-TOF MS -molekyylipainokuvaaja.



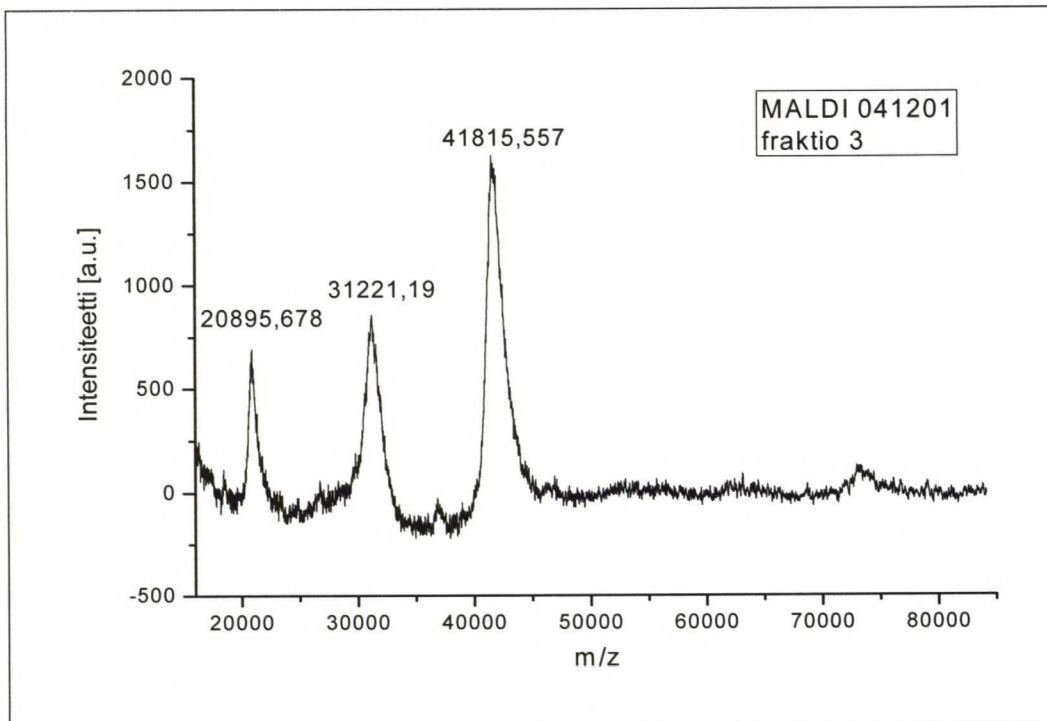
Kuvaaja 2. Vapaalla kupari(II)ionilla tehdyn MBP-H6-SSO₂ -fuusioproteiinin katkaisureaktion käänteisfaasikromatografialla puhdistetun reaktioliuoksen fraktion 30 MALDI-TOF MS -molekyylipainokuvaaja.



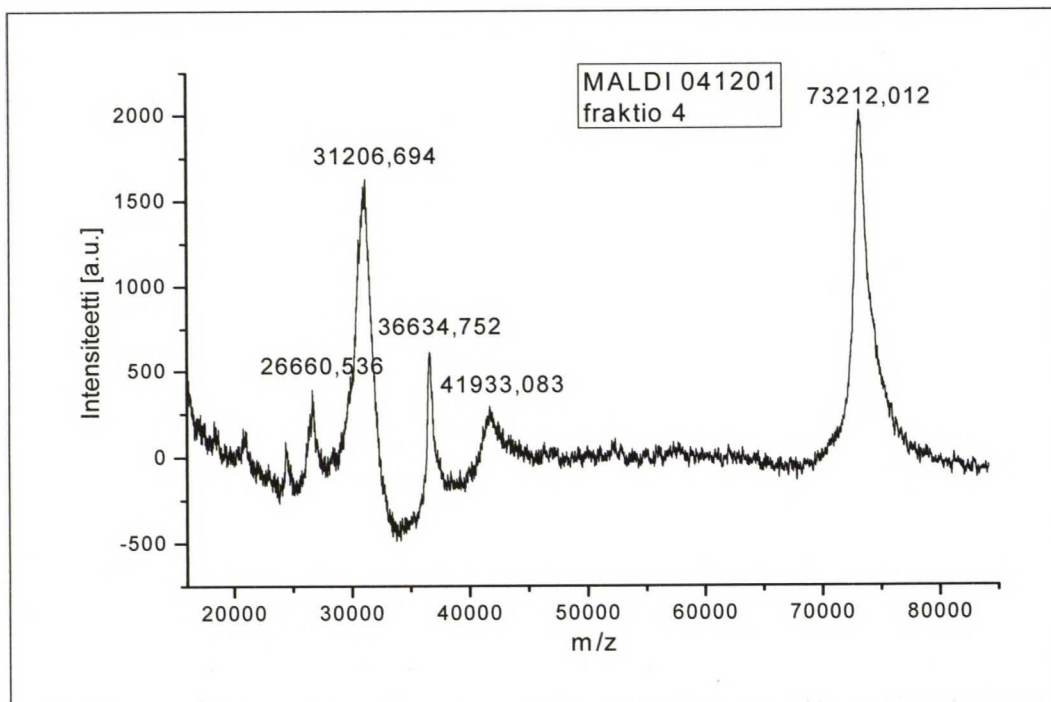
Kuvaaja 3. Vapaalla kupari(II)ionilla tehdyn MBP-H6-SSO₂ -fuusioproteiinin katkaisureaktion käänteisfaasikromatografialla puhdistetun reaktioliuoksen fraktion 31 MALDI-TOF MS -molekyylipainokuvaaja.



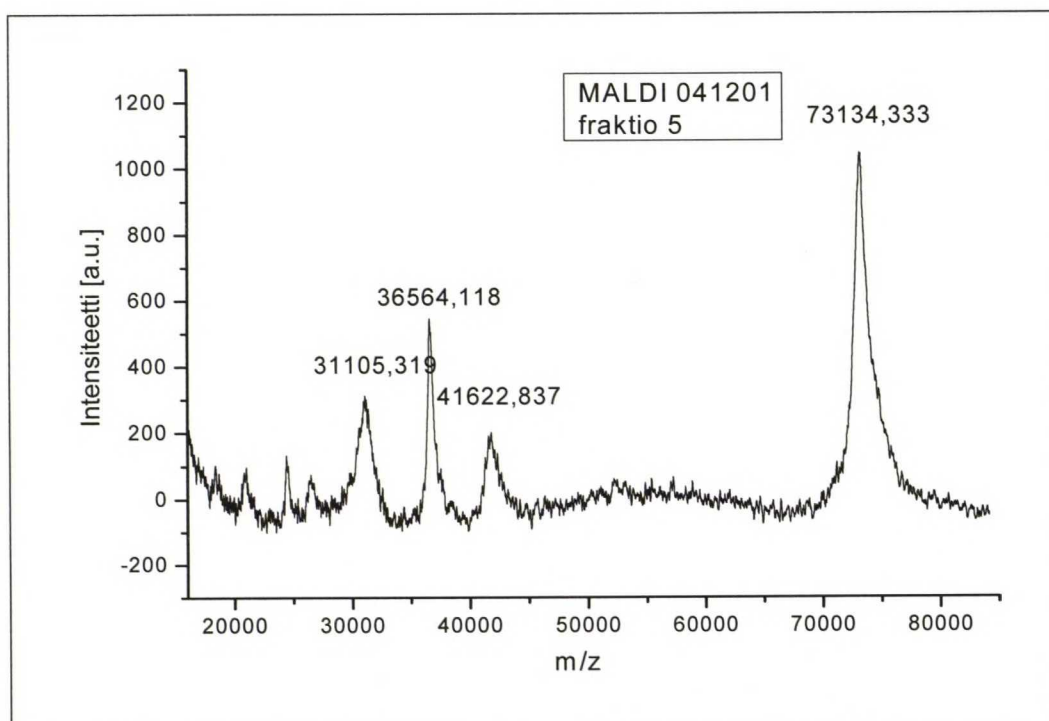
Kuvaaja 4. Vapaalla kupari(II)ionilla tehdyn MBP-H6-SSO₂ -fuusioproteiinin katkaisureaktion käänteisfaasikromatografialla puhdistetun reaktioliuoksen fraktion 2 MALDI-TOF MS -molekyylipainokuvaaja.



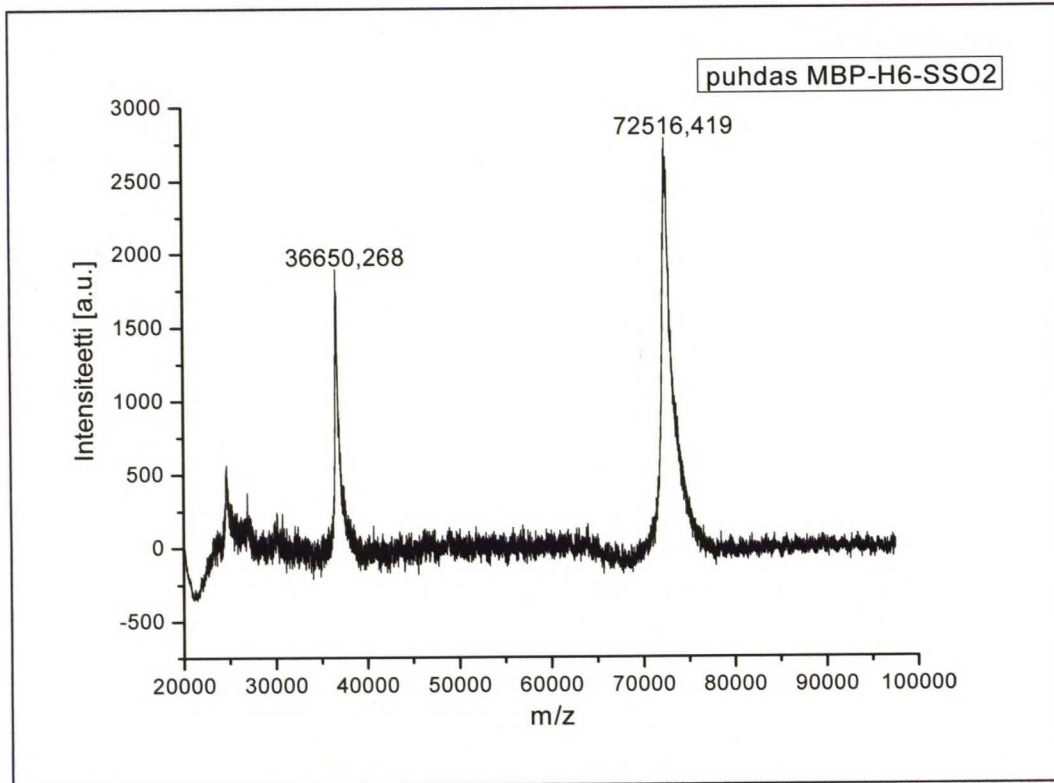
Kuvaaja 5. Vapaalla kupari(II)ionilla tehdyn MBP-H6-SSO₂ -fuusioproteiinin katkaisureaktion käänteisfaasikromatografialla puhdistetun reaktioliuoksen fraktion 3 MALDI-TOF MS -molekyylipainokuvaaja.



Kuvaaja 6. Vapaalla kupari(II)ionilla tehdyn MBP-H6-SSO₂ -fuusioproteiinin katkaisureaktion käänteisfaasikromatografialla puhdistetun reaktioliuoksen fraktion 4 MALDI-TOF MS -molekyylipainokuvaaja.



Kuvaaja 7. Vapaalla kupari(II)ionilla tehdyn MBP-H6-SSO2 -fuusioproteiinin katkaisureaktion käänteisfaasikromatografialla puhdistetun reaktioliuoksen fraktion 5 MALDI-TOF MS -molekyylipainokuvaaja.



Kuvaaja 1. Puhtaan *E. coli* -bakteerilla tuotetun MBP-H6-SSO2 -fuusioproteiinin MALDI-TOF MS -molekyylipainokuvaaja.

